

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Circulación y caracterización molecular de Rotavirus y
Escherichia coli asociados a diarrea neonatal y septicemia
en terneros

Por: Enrique L. Louge Uriarte

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A



2016

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Circulación y caracterización molecular de Rotavirus
y *Escherichia coli* asociados a diarrea neonatal
y septicemia en terneros

Por: Enrique L. Louge Uriarte

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A

Director: Dr. Anselmo C. Odeón, MSc., PhD

Co-directores: Dra. Viviana Parreño; Dr. Eduardo Esteban

Miembros del jurado:

Dr. Jorge O. Blackhall

Dra. María Gabriela Echeverría

Agradecimientos

Al Dr. Anselmo Odeón y a la Dra. Viviana Parreño por guiarme, formarme y acompañarme en este proceso de formación académica y científica.

A la Dra. Ana Rita Moreira por brindarme sus conocimientos de bacteriología, asesorarme y ayudarme en todo el trabajo de laboratorio de *E. coli*. Juntos pudimos comenzar con esta interesante línea de investigación.

Al Dr. Ramón González Pasayo y a Juana Ezcurdia por su participación, colaboración y ayuda para realizar el genotipado de las cepas de *E. coli*.

Al Dr. Samuel Miño por su colaboración incondicional para realizar los análisis filogenéticos de las cepas de rotavirus.

A las Dras. Alejandra Badaracco y Lorena Garaicoechea por la importante contribución brindada durante todos estos años.

Al Dr. Ernesto Späth y a la Med. Vet. Catalina Garzón por su asistencia para realizar el análisis estadístico de los resultados epidemiológicos de rotavirus.

Al Dr. Eduardo Esteban por su todo su apoyo brindado.

A María Rosa Leunda por haberme brindado sus conocimientos en diferentes técnicas virológicas y darme todo su apoyo.

A Rosana Malena, Jorgelina Lomónaco y Alejandra Méndez por su colaboración y buena predisposición para realizar todas las actividades de bacteriología.

A la Dra. Eleonora Morrell por su participación en la descripción histopatológica de tejidos.

A Lilian Lischinsky por su contribución para hacer los cortes histológicos de tejidos.

A mis compañeras del Laboratorio de Virología (Andrea, Susana, Erika y Maia) por haberme acompañando en todos estos años, manteniendo siempre el buen humor.

A todos los integrantes del SDVE (EEA Balcarce), veterinarios de la actividad privada, productores y personal de campo que gentilmente colaboraron para realizar este trabajo de tesis.

Al Vet. Federico Giannitti por su aporte en las coloraciones de Gram, inmunohistoquímica de rotavirus y fotos de cortes histológicos.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires por su buena predisposición y colaboración.

A Dios.....

Dedicatoria

A mis padres, Esteban y Susana, por haberme acompañado, aconsejado, apoyado y contenido durante todos estos años de esfuerzo y trabajo.

A mi hermano Esteban, Virginia y mis sobrinos por estar siempre a mi lado, brindándome consejos y alegría para superar las dificultades.

Resumen

Rotavirus, coronavirus y *Escherichia coli* son causas frecuentes de diarrea y septicemia en terneros neonatos y producen importantes pérdidas económicas. Si bien en Argentina hay estudios de ambos virus, es necesario disponer de información epidemiológica actualizada. Por otra parte, en nuestro país hay escasa información con respecto a los atributos de virulencia de *E. coli* asociada a diarrea y septicemia en terneros. Esta información es importante para el desarrollo de nuevas vacunas. En la presente tesis se evaluó la circulación de rotavirus y coronavirus en terneros de la provincia de Buenos Aires y se analizaron los genotipos de rotavirus y las relaciones filogenéticas entre las cepas. También se evaluó la patogenicidad de rotavirus G6(III)P[11] y G10P[11] en terneros. En una segunda etapa se caracterizaron los genes de virulencia (GV) de *E. coli* en muestras de terneros de establecimientos de la provincia de Buenos Aires. Además, se describió la patología asociada a la septicemia por *E. coli* en terneros y se la relacionó con los perfiles genéticos de virulencia.

El estudio de rotavirus y coronavirus incluyó 32 establecimientos (18 tambos y 14 campos de cría) distribuidos en 16 partidos de la provincia. Se recolectaron 422 muestras de materia fecal en terneros de tambo (diarrea, 137; sin diarrea, 103) y de cría para carne (diarrea, 104; sin diarrea, 78). La detección de ambos virus se realizó por ELISA y las muestras positivas a rotavirus fueron genotipificadas (tipos G y P). En una selección de cepas (tambo, 12; cría, 11) se realizó el análisis filogenético de VP7 y VP8*. Las secuencias deducidas de aminoácidos de ambas proteínas fueron comparadas con respecto a las cepas vacunales. Para el estudio de *E. coli* se cultivaron 212 muestras de materia fecal. Las mismas se obtuvieron de terneros procedentes de 10 tambos (diarrea, 60; sin diarrea, 61) y 6 campos de cría (diarrea, 66; sin diarrea, 25), distribuidos en 9 partidos de la provincia. Las muestras de órganos y fluidos corporales (35) de terneros con septicemia (9) se analizaron por cultivo bacteriológico (26) e histopatología (22). Los aislamientos de *E. coli* (confluencia y colonias) se analizaron por PCR para detectar GV de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC; *sta*, *stb*, *eltA*, *f5* y *f41*), *E. coli* verotoxigénica-enterohemorrágica (VTEC-EHEC; *vtx1*, *vtx2*, *eae* y *Ehly*), *E. coli* enteropatógena (EPEC; *eae* y *bfp*), *E. coli* necrotoxigénica (NTEC; *cnf1* y *cnf2*) y *E. coli* septicémica (SePEC; *f17G*, *papC*, *iucD*, *afa-8*, *clpG*, *cdtB* y *hlyA*). En algunos aislamientos de *E. coli* asociados a septicemia y meningitis se evaluó la resistencia antimicrobiana.

A partir del presente estudio se pudo demostrar que la circulación de rotavirus tuvo una amplia distribución en los tambos y campos de cría, mientras que la presencia de coronavirus quedó restringida a los establecimientos lecheros. La detección de rotavirus se asoció a la presencia de diarrea en ambos sistemas productivos y este virus es una causa importante de diarrea neonatal en nuestros rodeos. Las infecciones por rotavirus ocurrieron con mayor frecuencia en los terneros de cría y las infecciones por coronavirus fueron esporádicas. La frecuencia y diversidad de los genotipos G y P de rotavirus mostraron diferencias evidentes según el sistema productivo. En los terneros de cría existió un claro predominio de G6(IV)P[5], mientras que en los terneros

de tambo prevalecieron G6(III)P[11] y las infecciones mixtas (diferentes tipos G y P). Los análisis filogenéticos mostraron una correspondencia completa con los resultados de la genotipificación realizada por RT-PCR semi-anidada y múltiple, confirmando la utilidad de esta técnica con fines epidemiológicos. El análisis filogenético de VP7 indicó una íntima relación entre la primera cepa bovina G8P[11] de Argentina y diferentes cepas G8 de cabra y camélidos sudamericanos de nuestro país. Las cepas G6(IV)P[5] mostraron una estrecha relación filogenética de acuerdo a la ubicación geográfica de los establecimientos de cría para carne y, además, algunas cepas G6(IV)P[5] de tambo revelaron nuevas características filogenéticas. Las cepas circulantes G6(IV)P[5] y G10P[11] mantuvieron conservadas sus regiones antigénicas de VP7 y VP8* con respecto a las cepas vacunales. En cuanto a *E. coli*, el patotipo ETEC no sería una causa frecuente de diarrea en la región, aunque no se descarta su circulación. Los aislamientos de *E. coli* con GV característicos del patotipo SePEC (tipo-ExPEC) predominaron en las heces de terneros de cría y tambo. No se pudo establecer una relación entre la presencia de diarrea y la detección de GV o genotipos correspondientes a SePEC, NTEC y EPEC. Sin embargo, algunos aislamientos de *E. coli* obtenidos de materia fecal mostraron genotipos de virulencia idénticos a los observados en aislamientos de órganos y fluidos corporales de terneros con septicemia. Por lo tanto, una proporción importante de los terneros excreta cepas de *E. coli* potencialmente patógenas en sus heces, incluso en animales coinfectados con rotavirus y coronavirus. El marcador genético de virulencia *f17G* fue el más frecuente entre los aislamientos fecales de *E. coli*, independientemente de la condición clínica o el sistema productivo. Los aislamientos *E. coli* asociados a septicemia y meningitis presentaron perfiles genéticos de virulencia muy heterogéneos y el gen codificante para la aerobactina (*iucD*) fue el más importante.

Palabras clave

Ternero, diarrea, septicemia, rotavirus, genotipos, análisis filogenético, *Escherichia coli*, genes de virulencia.

Abstract

Rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* are important etiologies of neonatal calf diarrhea and septicemia. Both diseases have a great economic impact on livestock industry. Although both viruses have been studied in Argentina, current epidemiologic information is further needed. On the other hand, knowledge regarding the virulence attributes of *E. coli* associated to diarrhea and septicemia is scarce in our country. This information is important for vaccine development. The circulation of rotavirus and coronavirus in calves from Buenos Aires province was evaluated in the current thesis. The genotypes and phylogenetic relatedness among the circulating strains were also assessed. Moreover, the pathogenicity of G6(III)P[11] and G10P[11] strains was studied in a dairy calf model. In a second stage, the virulence genes (VG) of *E. coli* isolates from calves reared in farms of Buenos Aires province were characterized. Furthermore, histological lesions in dairy calves with septicemic colibacillosis were described and their associations with the virulence gene profiles of *E. coli* isolates were investigated.

The study of rotavirus and coronavirus was conducted in 32 farms (dairy, 18; beef, 14) situated in 16 counties from Buenos Aires province. Fecal samples (422) were collected from dairy (diarrheic, 137; non-diarrheic, 103) and beef (diarrheic, 104; non-diarrheic 78) calves. Rotavirus and coronavirus were detected by ELISA and positive samples were thereafter genotyped (G and P types). The genetic characterization of selected field strains (dairy, 12; beef, 11) was performed by nucleotide sequencing and phylogenetic analyses of VP7 and VP8*. Deduced amino acid sequences of both proteins were compared among circulating and vaccine strains. A comprehensive study for the VG of *E. coli* included 212 fecal samples from dairy (diarrheic, 60; non-diarrheic, 61) and beef (diarrheic, 66; non-diarrheic 25) calves, all of which belonged to 10 dairy and 6 beef farms distributed in 9 counties from Buenos Aires province. Several samples of organs and body fluids (35) were collected from septicemic calves (9) for standard bacteriological culture (26) and histopathology (22). Confluent bacterial growth and colonies of *E. coli* were analyzed by PCR to detect the virulence associated genes of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC; *sta*, *stb*, *eltA*, *f5* y *f41*), verotoxigenic-enterohemorrhagic *E. coli* (VTEC-EHEC; *vtx1*, *vtx2*, *eae* y *Ehly*), enteropathogenic *E. coli* (EPEC; *eae* y *bfp*), necrotoxigenic *E. coli* (NTEC; *cnf1* y *cnf2*) and septicemic *E. coli* (SePEC; *f17G*, *papC*, *iucD*, *afa-8*, *clpG*, *cdtB* y *hlyA*). Sensitivity to different antimicrobials was evaluated in *E. coli* selected strains from septicemic calves.

This study demonstrated that rotavirus circulation was widely distributed among dairy and beef farms, while the presence of coronavirus was restricted to dairy herds. The detection of rotavirus was associated to diarrhea in booth husbandry systems and this virus can be considered as an important etiology of neonatal calf diarrhea in our herds. Rotavirus infections were more frequent in beef calves while coronavirus infections were sporadic. The diversity and relative frequency of G and P genotypes were quite different according to the husbandry system. Most of the beef calves were infected with G6(IV)P[5] strains, while G6(III)P[11] and mixed infections

(different G and P types) were prevalent in dairy calves. Phylogenetic analyses were in complete agreement with the genotyping results obtained by hemi-nested multiplex RT-PCR, confirming the usefulness of this technique for epidemiological purposes. The phylogenetic analysis of VP7 indicated a very close genetic relatedness between the first G8P[11] bovine strain from Argentina and other G8 strains recovered from goats and South American camelids in our country. The G6(IV)P[5] strains infecting beef calves exhibited a close genetic relatedness according to the geographic location of the farms, and some G6(IV)P[5] strains from dairy farms displayed novel phylogenetic characteristics. The antigenic regions of VP7 and VP8* proteins from G6(IV)P[5] and G10P[11] strains were conserved when compared to reference vaccine strains. According to the genotyping results obtained for *E. coli*, the ETEC pathotype was not a frequent cause of diarrhea in the region under study, although its circulation cannot be dismissed. *E. coli* isolates from fecal samples of beef and dairy calves mainly displayed VG profiles typically of the SePEC pathotype. No relationship could be established between the presence of diarrhea and the detection of VG or genotypes corresponding to SePEC, NTEC and EPEC pathotypes. Nevertheless, some *E. coli* isolates from fecal samples exhibited virulence genotypes identical to those observed in isolates recovered from organs and body fluids of septicemic calves. Therefore, an important proportion of the calves population shed potentially pathogenic *E. coli* strains in their feces, even in calves coinfecting with rotavirus and coronavirus. Regardless of the clinical condition of the calves and the husbandry system, *f17G* could be considered as the main genetic virulence marker of fecal isolates. *E. coli* strains associated to septicemia and meningitis exhibited a great diversity in their virulence gene profiles and the aerobactin-coding gene (*iucD*) was the most important.

Keywords

Calf, diarrhea, septicemia, rotavirus, genotypes, phylogenetic analysis, *Escherichia coli*, virulence genes.

Abreviaturas

aa: aminoácido	SFB: suero fetal bovino
Ac/s: anticuerpo/s	TA: temperatura ambiente
AcM/s: anticuerpo/s monoclonal/es	TAE: Tris Acetato EDTA
ADN: ácido desoxirribonucleico	TP: transferencia pasiva
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario	UFF: unidades formadoras de focos fluorescentes
Ag/s: antígeno/s	VP: proteínas estructurales
ARN: ácido ribonucleico	
ARNdc: ácido ribonucleico de doble cadena	
ARNsc: ácido ribonucleico de simple cadena	
CCIF: cultivo celular e inmunofluorescencia	
CI: contenido intestinal	
CoV: coronavirus	
CoVB: coronavirus bovino	
DNT: diarrea neonatal del ternero	
dpi: días post-inoculación	
ELISA: ensayo inmunoenzimático	
FTP: fallas en la transferencia pasiva de inmunidad	
FITC: conjugado con isotiocianato de fluoresceína	
GV: genes de virulencia	
HN: hisopado nasal	
hpi: horas post-inoculación	
IC: inmunocromatografía	
IFD: inmunofluorescencia directa	
Ig/s: inmunoglobulina/s	
IHQ: inmunohistoquímica	
IN: intranasal	
ITU: infecciones del tracto urinario	
L+: lactosa positivo	
L(-): lactosa negativo	
LPS: lipopolisacárido	
ME: microscopía electrónica	
MF: materia fecal	
MIE: microscopía inmunoelectrónica	
NSP: proteínas virales no estructurales	
nt: nucleótido	
OR: oral	
ORF: marco de lectura abierta	
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida	
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	
RV: rotavirus	
RVA: rotavirus grupo A	
RT: transcripción reversa	
RT-PCR: transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa	

Índice General

<i>Resumen</i>	3
<i>Abstract</i>	5
<i>Abreviaturas</i>	7
Capítulo 1. “Introducción al tema de tesis y revisión bibliográfica”	
1. Producción de leche y carne en la provincia de Buenos Aires	12
2. Enfermedades infecciosas	13
2.1 <i>Diarrea neonatal de los terneros (DNT)</i>	13
2.2 <i>Septicemia</i>	14
2.3 <i>Importancia Económica</i>	14
2.4 <i>Prevalencia e incidencia de DNT y septicemia</i>	15
2.5 <i>Agentes infecciosos</i>	16
2.5.1 <i>Microbiología de la DNT</i>	16
2.5.2 <i>Estudios epidemiológicos de patógenos entéricos en diferentes países</i>	17
2.5.3 <i>Estudios epidemiológicos de patógenos entéricos en Argentina</i>	20
2.5.4 <i>Etiología de la bacteriemia y septicemia en terneros neonatos</i>	21
3. Rotavirus	23
3.1 <i>Generalidades y estructura del virión</i>	23
3.2 <i>Técnicas de diagnóstico</i>	31
3.3 <i>Clasificación y caracterización de RV</i>	31
3.4 <i>Genotipos de RVA en bovinos</i>	33
3.5 <i>Diarrea por RVA en terneros</i>	36
3.5.1 <i>Patogenia</i>	36
3.5.2 <i>Presentación clínica</i>	39
3.5.3 <i>Lesiones macroscópicas e histológicas</i>	39
4. Coronavirus	41
4.1 <i>Generalidades y estructura del virión</i>	41
4.2 <i>Técnicas de diagnóstico</i>	42
4.3 <i>Estudios epidemiológicos de CoVB en Argentina</i>	43
4.4 <i>Diarrea por CoVB en terneros</i>	43
4.4.1 <i>Patogenia</i>	43
4.4.2 <i>Presentación clínica</i>	46
4.4.3 <i>Lesiones macroscópicas e histológicas</i>	46

5. <i>Escherichia coli</i>	48
5.1 <i>Taxonomía</i>	48
5.2 <i>Morfología y características generales</i>	48
5.3 <i>Hábitat natural y persistencia en el ambiente</i>	49
5.4 <i>Importancia para la salud pública</i>	49
5.5 <i>Serogrupos y serotipos</i>	50
5.6 <i>Patotipos de E. coli</i>	50
5.6.1 <i>E. coli enterotoxigénica (ETEC)</i>	51
5.6.2 <i>E. coli enteropatógena (EPEC)</i>	56
5.6.3 <i>E. coli verotoxigénica (VTEC)</i>	60
5.6.4 <i>E. coli patógena extraintestinal (ExPEC)</i>	66
5.6.5 <i>E. coli necrotoxigénica (NTEC)</i>	79
Capítulo 2. “Circulación y caracterización molecular de rotavirus bovino en establecimientos de la provincia de Buenos Aires”	
1. Objetivos e hipótesis	85
1.1 <i>Objetivo general</i>	85
1.2 <i>Objetivos específicos</i>	85
1.3 <i>Hipótesis de trabajo</i>	85
2. Materiales y métodos	86
2.1 <i>Establecimientos productores de leche y carene</i>	86
2.2 <i>Terneros y muestras de materia fecal</i>	86
2.3 <i>Estudio longitudinal de RVA y CoVB en un establecimiento lechero</i>	87
2.4 <i>Detección de RVA en materia fecal</i>	87
2.5 <i>Detección de CoVB en materia fecal</i>	89
2.6 <i>Genotipificación de RVA bovino</i>	90
2.6.1 <i>Extracción ARN a partir de materia fecal</i>	90
2.6.2 <i>Determinación del tipo G</i>	90
2.6.3 <i>Determinación del tipo P</i>	93
2.6.4 <i>Electroforesis y revelado de los productos de PCR</i>	95
2.7 <i>Cepas de referencia de RVA</i>	95
2.8 <i>Estudio filogenético de las secuencias nucleotídicas de VP7 y VP8*</i>	96
2.8.1 <i>Purificación y secuenciación de los productos RT-PCR</i>	96

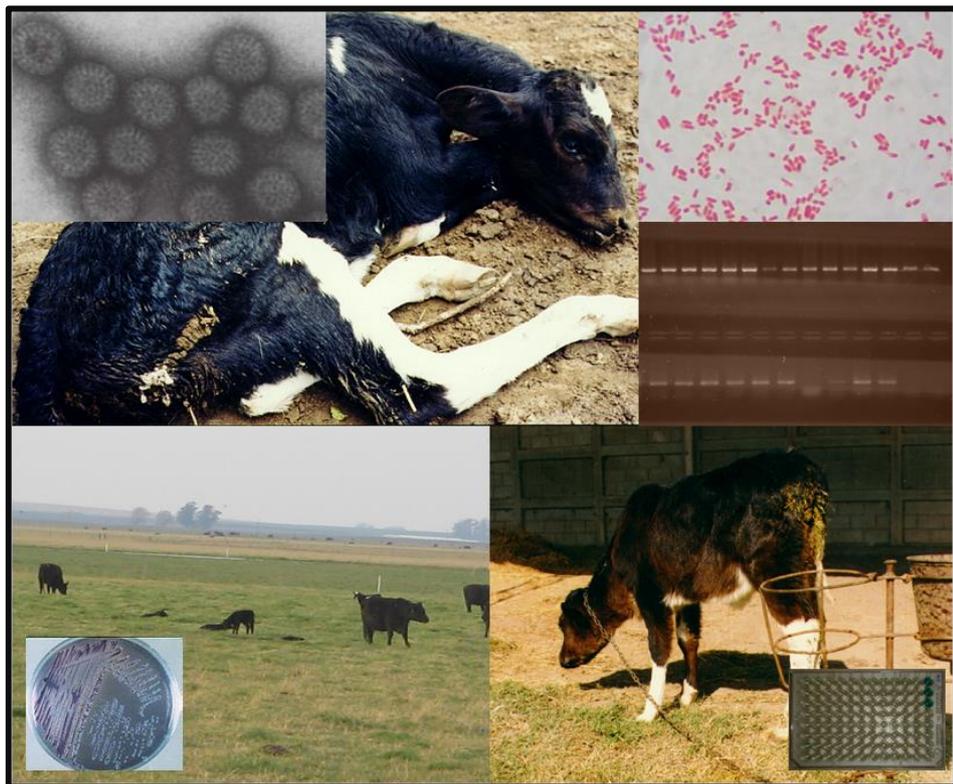
2.8.2 Edición de las secuencias génicas y análisis filogenético.....	97
2.8.3 Construcción de los gráficos de frecuencia de distancias.....	98
2.9 <i>Análisis estadístico</i>	98
2.10 <i>Modelo ternero para estudios de patogenicidad de RVA</i>	99
2.10.1 Terneros.....	99
2.10.2 Inoculación.....	99
2.10.3 Recolección de muestras, histopatología e inmunohistoquímica.....	99
2.10.4. Detección de RVA y caracterización molecular de las cepas.....	100
2.10.5 Titulación de las cepas de RVA.....	100
2.11 <i>Adaptación de RVA a cultivo celular</i>	101
2.11.1 Selección de la cepa.....	101
2.11.2 Cultivo celular.....	101
2.11.3 Preparación del inóculo e infección del cultivo celular.....	101
3. Resultados	102
3.1 <i>Circulación de RVA y CoVB en establecimientos de la provincia de Buenos Aires</i>	102
3.2 <i>Detección de RVA y CoVB en terneros según el sistema de producción y la condición clínica</i>	102
3.3 <i>Genotipificación de RVA bovino</i>	104
3.4 <i>Estudio longitudinal de RVA y CoVB en un establecimiento lechero</i>	106
3.5 <i>Análisis filogenético de las cepas circulantes de RVA bovino</i>	107
3.5.1 Linajes de las cepas correspondientes al genotipo G8.....	107
3.5.2 Linajes de las cepas correspondientes al genotipo G6.....	111
3.5.3 Análisis de las secuencias de aminoácidos de VP7 para el genotipo G6.....	114
3.5.4 Linajes de las cepas correspondientes al genotipo G10.....	114
3.5.5 Análisis de las secuencias de aminoácidos de VP7 para el genotipo G10.....	116
3.5.6 Linajes correspondientes a las cepas del genotipo P[5].....	116
3.5.7 Análisis de las secuencias de aminoácidos de VP8* para el genotipo P[5].....	120
3.5.8 Linajes correspondientes a las cepas del genotipo P[11].....	120
3.5.9 Análisis de las secuencias de aminoácidos de VP8* para el genotipo P[11].....	123
3.6 <i>Estudios de patogenicidad de RVA con cepas autóctonas de tambo</i>	123
3.7 <i>Adaptación de RVA a cultivo celular</i>	126
4. Discusión	127

Capítulo 3. “Caracterización molecular de *E. coli* asociada a diarrea y septicemia en terneros de establecimientos de la provincia de Buenos Aires”

1. Objetivos e hipótesis	144
1.1 <i>Objetivo general</i>	144
1.2 <i>Objetivos específicos</i>	144
1.3 <i>Hipótesis de trabajo</i>	144
2. Materiales y métodos	145
2.1 <i>Establecimientos</i>	145
2.2 <i>Terneros y muestras de materia fecal</i>	145
2.3 <i>Terneros de tambo y muestras de órganos y fluidos corporales</i>	146
2.4 <i>Bacteriología</i>	147
2.4.1 <i>Cultivo y aislamiento de <i>E. coli</i> a partir de muestras de MF</i>	147
2.4.2 <i>Cultivo y aislamiento bacteriológico a partir de órganos y fluidos corporales</i>	147
2.4.3 <i>Identificación de <i>E. coli</i></i>	148
2.5 <i>Extracción y conservación del ADN</i>	149
2.6 <i>Detección de genes de virulencia de <i>E. coli</i></i>	149
2.6.1 <i>Amplificación de genes de virulencia por PCR</i>	149
2.6.2 <i>Electroforesis y revelado de los productos de PCR</i>	152
2.6.3 <i>Cepas de referencia de <i>E. coli</i></i>	152
2.7 <i>Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos</i>	154
2.8 <i>Análisis estadístico</i>	154
3. Resultados	155
3.1 <i>Detección genotípica de factores de virulencia de <i>E. coli</i> en materia fecal</i>	155
3.2 <i>Caracterización genotípica de factores de virulencia</i>	160
3.2.1 <i>Aislamientos de <i>E. coli</i> obtenidos de materia fecal en terneros de tambo</i>	160
3.2.2 <i>Aislamientos de <i>E. coli</i> obtenidos de materia fecal en terneros de cría para carne</i>	162
3.3 <i>Aislamientos bacterianos y genes de virulencia de <i>E. coli</i> en terneros con septicemia</i>	166
3.4 <i>Resistencia antibiótica en aislamientos de <i>E. coli</i> asociados a septicemia</i>	168
3.5 <i>Descripción histopatológica de las lesiones en terneros con septicemia</i>	168
3.6 <i>Comparación de los perfiles de genes de virulencia en aislamientos de <i>E. coli</i></i>	176
3.7 <i>Infecciones combinadas por RVA, CoVB y <i>E. coli</i> portador de genes de virulencia</i>	177
4. Discusión	179
Consideraciones finales y conclusiones	199
Bibliografía	201
Apéndice 1	234
Apéndice 2	282

CAPÍTULO 1

“Introducción al tema de tesis y revisión bibliográfica”



Vet. Enrique L. Louge Uriarte

1. Producción de leche y carne en la provincia de Buenos Aires

La provincia de Buenos Aires genera el 25% de la producción total de leche del país (11.338 millones de litros) (MAGyP, 2012), ocupando el tercer lugar luego de Córdoba (37%) y Santa Fe (32%) (MAGyP, 2012; Sánchez *et al.*, 2012). Las principales regiones lecheras de la provincia de Buenos Aires incluyen la cuenca Oeste (51% de los tambos), Abasto Norte y Sur (40%) y Mar y Sierras (9%) (Ordoqui *et al.*, 2003; MAA, 2013) (Fig. 1.1). El stock bovino destinado a la producción de leche en la provincia de Buenos Aires es de aproximadamente 946.333 animales (Rossanigo y Arano, 2012). La crianza de terneros en las principales cuencas lecheras del país se realiza mediante sistemas individuales en estaca (78,2%) y jaula (5,4%) o con sistemas colectivos (14,4%) (Carbonero *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos tambos todavía utilizan las vacas ama (Fernández, 1997). La leche es el principal alimento destinado al consumo de los terneros (70-89%) (Fernández, 1997; Carbonero *et al.*, 2007), aunque también se emplea el sustituto lácteo en menor proporción (20-25%) (Fernández, 1997).

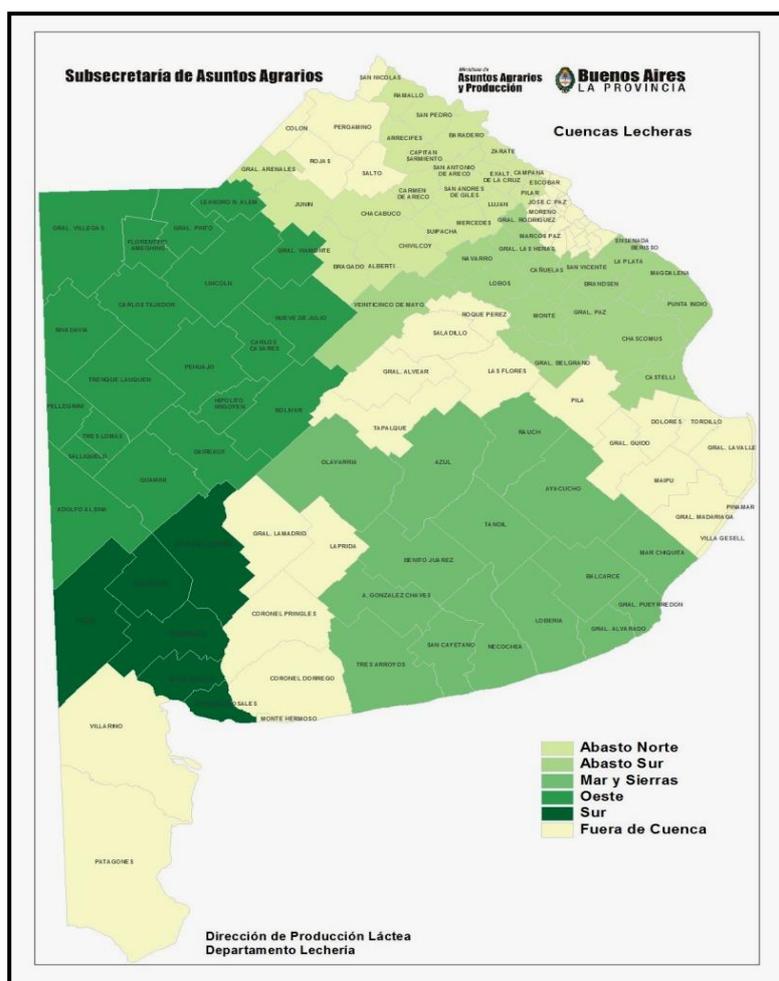


Fig. 1.1. Principales cuencas lecheras de la provincia Buenos Aires: Abasto Norte, Abasto Sur, Mar y Sierras, Oeste, Sur y Fuera de Cuenca. Fuente: Ministerio de Asuntos Agrarios.

En cuanto a la producción de carne, el stock bovino de la provincia de Buenos Aires alcanzó 15.759.604 existencias para el año 2012 (Rossanigo y Arano, 2012). La Cuenca del Salado y la depresión de Laprida son las principales zonas de cría bovina de la provincia y del país (Carrillo, 2001; Rossanigo y Arano, 2012). Durante el año 2012 estas zonas contribuyeron con el 17,3% de la producción total de terneros del país (Fig. 2.1) (Rossanigo y Arano, 2012).

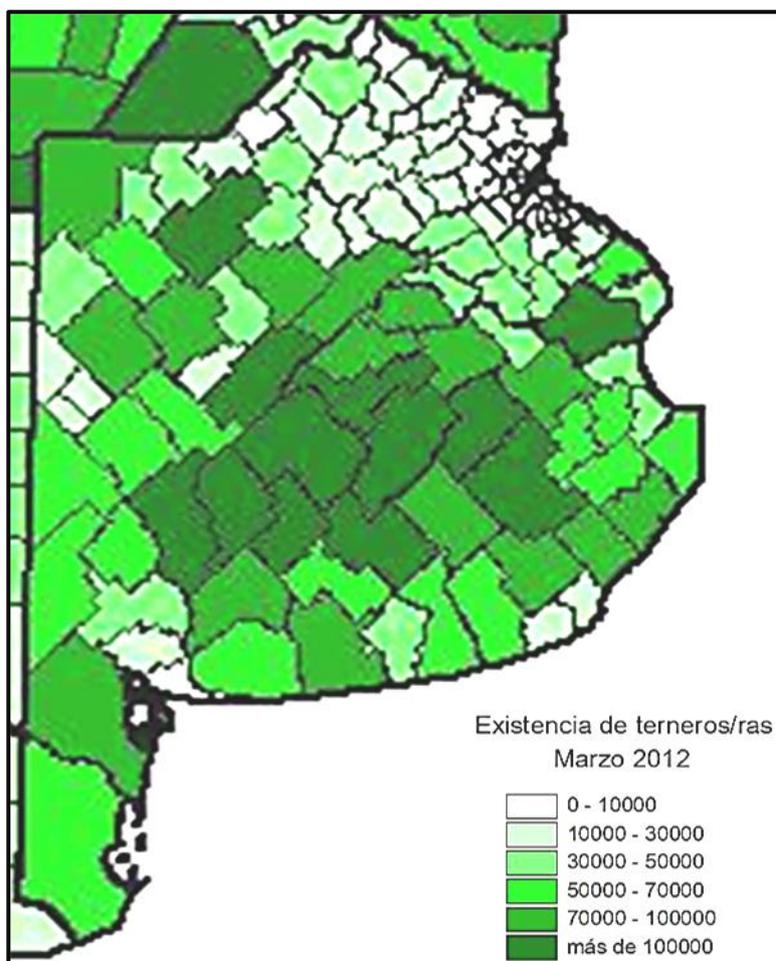


Fig. 2.1. Existencias de terneros en diferentes partidos de la provincia de Buenos Aires. Los datos son del año 2012 y fueron provistos por el SENASA, Sistema de Gestión Sanitaria, Coordinación de Campo, Dirección Nacional de Sanidad Animal. Fuente: Rossanigo y Arano, 2012.

2. Enfermedades infecciosas

2.1 *Diarrea neonatal de los terneros (DNT)*

La diarrea se define como un incremento en la pérdida de agua a partir de las heces (Scott *et al.*, 2004; Radostitis *et al.*, 2007). No obstante, la diarrea en terneros se estudia como un complejo de enfermedades o síndrome (Radostits *et al.*, 2007), el cual recibe diferentes denominaciones, entre ellas diarrea aguda indiferenciada de los terneros (Radostits y Acres, 1980; Radostits *et al.*, 2007), síndrome diarreico neonatal de los terneros, “Diarrea Blanca” o diarrea neonatal de los terneros (DNT) (Margueritte *et al.*, 2001). La DNT es un síndrome complejo y multifactorial (Tzipori, 1981a; Paul y Lyoo, 1993; Scott *et al.*, 2004) en el cual

interactúan factores predisponentes y diferentes agentes infecciosos (virus y bacterias) y parasitarios (protozoos) (Paul y Lyoo, 1993; Scott *et al.*, 2004; Radostits *et al.*, 2007). Generalmente afecta a terneros recién nacidos y hasta los 45 días de vida (Odeón, 1980; Fernández, 1997), aunque los casos de diarrea se presentan con mayor frecuencia en las primeras 2-3 semanas de vida (Doll, 2005; Radostits *et al.*, 2007; Gunn *et al.*, 2010).

2.2 Septicemia

La septicemia es una afección sistémica asociada a la presencia y persistencia de microorganismos patógenos y sus toxinas en la sangre. En esta definición está implícito que el animal se encuentra enfermo. Por el contrario, el término bacteriemia hace referencia a un hallazgo de laboratorio que consiste en la detección de bacterias en una muestra de sangre por medio del cultivo. En general, este término no implica necesariamente un efecto sistémico de la bacteria (Fecteau *et al.*, 2009).

Los casos de septicemia neonatal en terneros suelen ser esporádicos, aunque pueden presentarse en forma de brotes si las condiciones de manejo no son adecuadas (fallas de calostrado y elevada exposición a patógenos). Esta enfermedad afecta, comúnmente, a terneros de tambo menores a 2 semanas de vida (Fecteau *et al.*, 2009; Gyles y Fairbrother, 2010) que han sufrido una falla en la transferencia pasiva (FTP) de inmunidad calostrada (Fecteau *et al.*, 2009). No obstante, también existe una presentación clínica de curso más crónico y menos fulminante, la cual se observa en terneros de 7-28 días de vida (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009).

2.3 Importancia económica

La DNT ocasiona pérdidas económicas muy importantes para la industria pecuaria (Holland, 1990) que se atribuyen a la muerte de terneros (Scott *et al.*, 2004; Reidy *et al.*, 2006; Swiatek *et al.*, 2010), los gastos en tratamientos, la mayor demanda de personal y el menor desarrollo corporal, entre otros (Mee, 2008; Millemann, 2009). En EEUU se estimó un costo total promedio (incluida la prevención) de 33,46 dólares por ternero (Kaneene y Hurd, 1990). Con respecto al efecto de la enfermedad en el desarrollo corporal, un trabajo realizado en rodeos de carne (Colorado, EEUU) demostró que la DNT tuvo un efecto significativo en el peso al destete de los terneros, produciendo una disminución de 10,7 kg (Wittum *et al.*, 1994). En Argentina, un estudio en rodeos de carne comparó el peso promedio al destete (5-7 meses) entre terneros afectados de diarrea durante el primer mes de vida (161,4 kg) y terneros clínicamente sanos (169,2 kg), encontrándose una diferencia de 7,18 kg entre ambos grupos ($p < 0,05$) (Cornaglia *et al.*, 1992).

2.4 Prevalencia e incidencia de DNT y septicemia

Los terneros tienen un mayor riesgo de morir en las primeras 2 semanas de vida (Radostits *et al.*, 2007) y especialmente durante la primera semana (Wells *et al.*, 1996; Radostits *et al.*, 2007). La diarrea y septicemia son las enfermedades más frecuentes en el transcurso de este período (Radostits *et al.*, 2007). En Argentina, la DNT es la enfermedad registrada con mayor frecuencia y es una de las principales causas de mortalidad en terneros de cría para carne. La incidencia promedio es del 20% (Zaroso y Margueritte, 1999) hasta el 35-45% (Bellinzoni *et al.*, 1989). Sin embargo, esta última varía considerablemente entre rodeos y establecimientos (Bendali *et al.*, 1997; Radostits *et al.*, 2007). Algunos de ellos no presentan problemas de diarrea, mientras que otros son endémicos (Zaroso y Margueritte, 1999) y alcanzan prevalencias muy elevadas (70-77%) (Bellinzoni *et al.*, 1989; Cornaglia *et al.*, 1992). En los rodeos vacunados, la incidencia de DNT varía desde el 9% hasta el 23-35% (Bellinzoni *et al.*, 1989). La mortalidad asociada a DNT puede ser del 1-2% (Cornaglia *et al.*, 1992) hasta el 5-20% (Bellinzoni *et al.*, 1989; Zaroso y Margueritte, 1999). Según el año, las condiciones medioambientales y el manejo sanitario de los establecimientos, los índices de morbilidad y mortalidad pueden ser elevados (Fernández, 1997).

En EEUU, la DNT fue responsable de más del 50% de las muertes ocurridas durante los años 1991, 1996, 2002 y 2007 (USDA, 2008). Un estudio longitudinal y prospectivo realizado en Francia registró una tasa de incidencia promedio del 14,6% en terneros de rodeos de carne. Algunos establecimientos no tuvieron problemas de DNT, mientras que otros presentaron incidencias mayores al 50% (Bendali *et al.*, 1997). En Argentina, un estudio realizado durante 7 años (2001-2007) evaluó las enfermedades más frecuentes en terneros de la región centro-sur de la provincia de Buenos Aires. La DNT representó el 13,7% de los casos de enfermedad ($n = 2555$) en terneros de rodeos de cría, con una morbilidad del 15,9% y una mortalidad del 1,4%. En los terneros de rodeos lecheros, la DNT constituyó el 16,8% de los casos de enfermedad ($n = 250$), con una morbilidad del 27,2% y una mortalidad del 7,8% (Späth *et al.*, 2012). En cambio, un estudio realizado con 3072 terneros de 12 rodeos lecheros (partidos de Azul y Rauch) determinó que el 78,2% de los casos de enfermedad y el 46,5% de las muertes fueron atribuidos a la DNT (Quiroz García y Ruiz, 2012). En otro relevamiento (1986-2001) llevado a cabo en la provincia de Buenos Aires se evaluaron las causas de mortalidad en 150 terneros menores a 1 mes de vida. El 46,6% de los casos estuvieron asociados a diarrea/enteritis, el 2% a neumonía/enteritis y el 2,7% a septicemia (Costa *et al.*, 2004). Por otra parte, en un trabajo regional se estudiaron 34 casos de enfermedad en terneros neonatos y se determinó que el

20,6% desarrolló septicemia, la cual se diagnosticó por cultivo bacteriológico e histopatología (Fernández *et al.*, 2007).

2.5 Agentes infecciosos

2.5.1 Microbiología de la DNT

La DNT puede tener distintas causas, tanto infecciosas como no infecciosas (Cho *et al.*, 2014). Sin embargo, sin dejar de lado las causas nutricionales, el origen generalmente es de tipo infeccioso (Fernández, 1997) y diferentes patógenos entéricos (virus, bacterias y protozoos) están implicados en la enfermedad (Cho *et al.*, 2014). Las principales etiologías de la DNT incluyen rotavirus (RV), coronavirus (CoV), *Cryptosporidium* spp., *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC, del inglés) (Doll, 2005; Gunn *et al.*, 2010; Izzo *et al.*, 2015). Sin embargo, existen otros agentes etiológicos que se diagnostican con mucha menor frecuencia y entre ellos se incluyen torovirus bovino (Breda virus), calicivirus, parvovirus, virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) y *Clostridium perfringens* tipo C (Gunn *et al.*, 2010; Izzo *et al.*, 2015). La prevalencia de cada patógeno y la incidencia de la enfermedad varían según la localización geográfica, las prácticas de manejo de los establecimientos y el tamaño de los rodeos (Cho *et al.*, 2014).

Con respecto a *E. coli* en particular, existen cepas que tienen la capacidad de producir la lesión de adherencia y borrado (A/E) (AEEC, *attaching and effacing E. coli*) y pueden estar implicadas en casos de diarrea y disentería (Doll, 2005; Radostitis *et al.*, 2007; Blanchard 2012; Izzo *et al.*, 2015). Las cepas AEEC poseen factores de virulencia y pertenecen a serogrupos que permiten clasificarlas como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC). La participación de EHEC como causa diarrea y disentería en terneros ha sido demostrada en condiciones naturales (Schoonderwoerd *et al.*, 1988; Gunning *et al.*, 2001; Wani *et al.*, 2005) y experimentales (Dean Nystrom *et al.*, 1997, 1998; Stordeur *et al.*, 2000). Por otra parte, *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) también es capaz de causar diarrea y septicemia en terneros parcialmente calostrados (Van Bost *et al.*, 2001b, 2003).

Las infecciones simples producidas por un solo patógeno entérico pueden causar diarrea, aunque es frecuente observar infecciones múltiples en los terneros enfermos (Cho *et al.*, 2014). En estas últimas participan más de un patógeno en el mismo animal (Bulgin *et al.*, 1982; Reynolds *et al.*, 1986; Cho *et al.*, 2014) y también se las denomina co-infecciones o infecciones mixtas. Las infecciones múltiples se detectan con mayor frecuencia en los terneros diarreicos con respecto a aquellos sanos (Reynolds *et al.*, 1986; de la Fuente *et al.*, 1998) y es uno de los

factores que determina la presentación clínica de la diarrea (Reynolds *et al.*, 1986). En relación a este concepto, estudios llevados a cabo en Australia (Izzo *et al.*, 2011), Estados Unidos (Bulgin *et al.*, 1982) y España (de la Fuente *et al.*, 1998) demuestran que las infecciones mixtas son frecuentes en terneros con diarrea.

Para el diagnóstico microbiológico de la DNT es necesario tener en cuenta algunas premisas. Primero, es importante que el diagnóstico se realice a nivel de rodeo y para ello se deben recolectar muestras de varios terneros con diarrea (Morgan, 1990). El muestreo de un grupo de terneros afectados brinda una evidencia más robusta, sobre todo cuando se identifican varios patógenos en diferentes animales (Izzo y cols., 2011). Segundo, muchos establecimientos son endémicos para algunos agentes infecciosos (RV y *Cryptosporidium* spp.). Por lo tanto, el diagnóstico se basa en la mayor frecuencia de detección de estos patógenos en los terneros diarreicos con respecto a aquellos sin diarrea (Morgan, 1990).

2.5.2 Estudios epidemiológicos de patógenos entéricos en diferentes países

A continuación se detallan algunos estudios realizados en diferentes países, los cuales evaluaron la importancia de los distintos agentes infecciosos de la DNT. Cada estudio se describe por separado ya que los criterios de selección de terneros, las técnicas de laboratorio utilizadas y el espectro de agentes infecciosos evaluados fueron diferentes.

En el Reino Unido se realizaron dos estudios durante la década de los años 80. En uno de ellos se analizaron terneros diarreicos ($n = 302$) y sin diarrea ($n = 49$) de 1-28 días de vida, los cuales procedían de 32 granjas (8 tambos y 24 rodeos de carne) (Snodgrass *et al.*, 1986). En el otro estudio se evaluaron terneros diarreicos ($n = 490$) y sin diarrea ($n = 385$), menores a 42 días de vida, durante 45 brotes de diarrea (Reynolds *et al.*, 1986). RV fue el principal patógeno y se detectó en el 42% (208/490) (Reynolds *et al.*, 1986) y 50% (152/302) (Snodgrass *et al.*, 1986) de los terneros diarreicos. Las infecciones por RV fueron simples (35,4%, 107/302) o co-infecciones (15%, 45/302) asociadas a CoV, *Cryptosporidium* spp. o ambos agentes (Snodgrass *et al.*, 1986). CoV se detectó con menor frecuencia y fue identificado en el 8% (24/302) (Snodgrass *et al.*, 1986) y 14% (69/490) (Reynolds *et al.*, 1986) de los terneros con diarrea. Las infecciones por CoV fueron simples (3,6%, 11/302) o co-infecciones (4,3%, 13/302) asociadas a RV, *Cryptosporidium* spp. o ambos patógenos (Snodgrass *et al.*, 1986). La detección de *Cryptosporidium* spp. alcanzó el 13% (39/302) (Snodgrass *et al.*, 1986) y 23% (106/465) (Reynolds *et al.*, 1986) de los terneros con diarrea. Con respecto a ETEC, las frecuencias de asilamientos positivos en terneros diarreicos fueron del 3% (9/310) (Reynolds *et al.*, 1986) y 3,6% (11/302) (Snodgrass *et al.*, 1986). Los aislamientos de *Salmonella* spp. se obtuvieron en el

0,6% (2/302) (Snodgrass *et al.*, 1986) y 12% (58/490) (Reynolds *et al.*, 1986) de los terneros con diarrea.

En aquellos establecimientos en los cuales se evaluaron terneros enfermos y sanos, las prevalencias de RV fueron del 42% (186/439) (Reynolds *et al.*, 1986) y 51,5% (66/128) (Snodgrass *et al.*, 1986) en los terneros diarreicos, mientras que se registraron prevalencias del 13% (51/385) (Reynolds *et al.*, 1986) y 18,3% (9/49) (Snodgrass *et al.*, 1986) en aquellos animales sin diarrea ($p < 0,001$). Por otra parte, en uno de los estudios no se observaron diferencias significativas al comparar las prevalencias de CoV, *Cryptosporidium* spp., ETEC y *Salmonella* spp. en terneros diarreicos y sanos (Snodgrass *et al.*, 1986). En cambio, en el otro estudio, los terneros enfermos presentaron mayores prevalencias de CoV (14% vs. 0%), *Cryptosporidium* spp. (21% vs. 8%) y *Salmonella* spp. (12% vs. 3%) con respecto a los terneros sin diarrea ($p < 0,001$) (Reynolds *et al.*, 1986). En ambos trabajos se demostró que RV fue el patógeno predominante, ya que se excretó en más del 50% de los terneros evaluados y estuvo presente en la mayoría de los establecimientos (78%) (Snodgrass *et al.*, 1986) o brotes de diarrea (93%) (Reynolds *et al.*, 1986). La detección de CoV fue menor en los terneros evaluados y su circulación alcanzó el 41% de los establecimientos (Snodgrass *et al.*, 1986) y el 56% de los brotes (Reynolds *et al.*, 1986).

En España (1993) se evaluó la presencia de RV, CoV, *Cryptosporidium* spp., *E. coli* F5⁺ (ETEC) y *Salmonella* spp. en terneros de tambo ($n = 218$) con diarrea procedentes de 65 rodeos lecheros. Los terneros muestreados pertenecieron a cuatro grupos por edades (1-7 días, 8-14 días, 15-21 días y 22-30 días) y no se incluyeron terneros sin diarrea. Los patógenos identificados, tanto en las infecciones simples como mixtas, incluyeron *Cryptosporidium* spp. (52,3%), RV (42,7%), *E. coli* F5⁺ (12%), CoV (7,3%) y *Salmonella* spp. (0,9%). En los terneros infectados con *E. coli* F5⁺ no hubo diferencias significativas en cuanto a su distribución según los grupos por edades: 12,5% (1-7 días), 10,5% (8-14 días), 14,7% (15-21 días) y 6,9% (22-30 días). Asimismo, el porcentaje de detección para RV no varió entre los diferentes grupos (46,9%, 45,6%, 33,8% y 48,3%, respectivamente). Un hallazgo relevante fue la elevada proporción de infecciones mixtas por dos (21,6%), tres (6%) y hasta cuatro (0,5%) patógenos entéricos. Las infecciones mixtas asociadas a RV y *Cryptosporidium* spp. fueron las más frecuentes (15,1%) (de la Fuente *et al.*, 1998; García *et al.*, 2000).

Un estudio epidemiológico realizado en Australia (2007-2008) evaluó los diferentes patógenos entéricos en terneros diarreicos ($n = 597$) menores a 42 días de vida, los cuales procedían de tambos ($n = 76$) o de tambos donde se realizaba engorde ($n = 8$). Los terneros

fueron estratificados por edades (0-4, 5-14, 15-21 y >21 días). En el 97,6% de los establecimientos y en el 95% de los terneros se identificaron patógenos entéricos. RV fue detectado en al menos una muestra de MF en el 80% de los tambos y en el 100% de los tambos con engorde. Por otra parte, CoV circuló en el 20% y 40% de los establecimientos, respectivamente. La detección de *E. coli* F5⁺ (ETEC) fue similar en ambos tipos de explotación (20 y 15%, respectivamente). En los terneros evaluados, las infecciones simples o mixtas por RV fueron las más importantes (79,9%), seguidas en orden de frecuencia por *C. parvum* (58,5%), *Salmonella* spp. (23,8%), CoV (21,6%) y *E. coli* F5⁺ (17,4%). Las infecciones mixtas asociadas a dos (42,4%), tres (22,3%) y cuatro (6,2%) patógenos entéricos fueron usuales. RV fue el agente etiológico detectado con mayor frecuencia en todos los grupos por edades. Posiblemente, el elevado porcentaje de infecciones por RV se debió a la utilización de PCR en tiempo real como técnica de diagnóstico, la cual tiene una elevada sensibilidad y especificidad. Por otra parte, el hallazgo de *E. coli* F5⁺ en todos los grupos por edad, aún en los terneros mayores a 21 días, fue interesante. Sin embargo, el 50% de los terneros infectados por *E. coli* F5⁺ tuvieron menos de 4 días de vida. Teniendo en cuenta los sistemas de producción, RV y *Salmonella* spp. se detectaron con mayor frecuencia en las explotaciones de tambo que realizaban engorde de terneros ($p < 0,05$) (Izzo *et al.*, 2011).

En Austria se llevó a cabo un relevamiento (2004-2005) de los agentes infecciosos asociados a la DNT. Para el estudio se incluyeron granjas con casos de diarrea ($n = 50$) y sin casos ($n = 50$) en las últimas 3 semanas. En las granjas con problemas de diarrea se seleccionó un número similar de terneros sanos, en caso de haber disponibles. Los animales muestreados incluyeron terneros menores a 42 días de vida con diarrea ($n = 90$), sanos ($n = 105$) y sanos en contacto con terneros diarreicos ($n = 35$). CoV se detectó en una mayor proporción de terneros diarreicos (40%) que sanos (16,4%). Asimismo, RV se detectó con mayor frecuencia en terneros enfermos (21,1% vs. 1,4%). Con respecto a *Cryptosporidium*, también se observó una mayor frecuencia de detección en terneros diarreicos comparada con aquellos sin diarrea (25,6% vs. 2,9%). En cambio, *E. coli* F5⁺ se detectó en un solo ternero sin diarrea (0,7%). Con respecto a *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), el 15,5% de los terneros diarreicos y el 15% de los terneros sanos presentaron aislamientos STEC con genotipos de virulencia *stx1*⁺, *stx2*⁺ o *stx1*⁺+*stx2*⁺. El 35,7% (5/14) de los aislamientos STEC de terneros diarreicos y el 19% (4/21) de los aislamientos STEC de terneros sanos resultaron positivos para *eae*+*Ehly* (intimina y enterohemolisina, respectivamente) (Herrera-Luna *et al.*, 2009).

En Suiza se evaluaron terneros ($n = 147$) con diarrea (1-21 días de vida) en un total de 71 tambos. Como criterio cada establecimiento se consideró positivo a un patógeno entérico cuando al menos dos terneros excretaron dicho patógeno. Las muestras de MF se analizaron para *Cryptosporidium parvum*., RV, CoV y *E. coli* F5⁺. El 91,2% de los terneros resultaron positivos a la detección de patógenos entéricos y las prevalencias calculadas fueron del 58,7% (RV), 55% (*C. parvum*), 7,8% (CoV) y 5,5% (*E. coli* F5⁺). Las infecciones con un solo patógeno se identificaron el 58,6% de los terneros y las infecciones mixtas asociadas a RV y *C. parvum* fueron las más frecuentes (19%). Las prevalencias a nivel de establecimientos fueron del 52,1% (RV), 41,7% (*C. parvum*), 2,1% (CoV) y 2,1% (*E. coli* F5⁺) (Lanz Uhde *et al.*, 2008).

2.5.3 Estudios epidemiológicos de patógenos entéricos en Argentina

Un relevamiento realizado en la década de 1980 evaluó la presencia de RV, ETEC, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* y coccidios en heces de terneros ($n = 211$) menores a 45 días de vida con diarrea ($n = 59$) y sin diarrea ($n = 152$). Los animales provenían de 10 tambos ubicados en la cuenca de Abasto, provincia de Buenos Aires. RV se detectó en el 27% de los terneros diarreicos y en el 12% de los terneros sin diarrea. El 83% de los terneros diarreicos positivos a RV tenían de 1-3 semanas de vida. ETEC se aisló en el 30% de los terneros diarreicos y en el 23% de los terneros sin diarrea. El 72% de las cepas de *E. coli* aisladas de terneros diarreicos presentaron el Ag K99 (F5⁺) o produjeron la toxina termoestable (ST). Los terneros diarreicos positivos al aislamiento de ETEC se hallaron, principalmente, durante la 1 ra. (62%) y 2 da. (24%) semana de vida. *Salmonella* spp. se aisló en el 10% de los terneros diarreicos y en el 3% de los animales sin diarrea. La frecuencia de aislamientos positivos a *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* o la detección de coccidios fueron similares en ambos grupos de terneros. Las infecciones combinadas de RV y ETEC se detectaron en el 7% de los terneros diarreicos y en el 1,3% de los terneros sin diarrea (Barrandeguy *et al.*, 1988).

Posteriormente, a fines de la década de los años 80, se evaluó la circulación de diferentes patógenos (RV, *Cryptosporidium*, *Salmonella* y ETEC) en terneros ($n = 452$) con diarrea (hasta 1 mes de vida). Estos animales procedían de 36 campos de cría y 33 tambos ubicados en las provincias de Buenos Aires (59%), Córdoba (18%), Santa Fe (16%), Entre Ríos (5%) y La Pampa (2%). La búsqueda de ETEC sólo se hizo en los terneros menores a 15 días de vida ($n = 212$). RV y *Cryptosporidium* spp. fueron los agentes detectados con mayor frecuencia. En los campos de cría se demostró la circulación de RV (89%), *Cryptosporidium* spp. (75%) y la co-circulación de RV y *Cryptosporidium* spp. (55,6%). Los terneros de cría con diarrea

presentaron infecciones por RV (45%) y *Cryptosporidium* spp. (30,5%), aunque las coinfecciones por ambos agentes se presentaron con menor frecuencia (8,9%). En los tambos evaluados se detectó la circulación de RV (57,5%), *Cryptosporidium* spp. (69,7%) y la co-circulación de RV y *Cryptosporidium* spp. (39,4%). Los terneros de tambo con diarrea presentaron infecciones por RV (23%) y *Cryptosporidium* spp. (30%), mientras que las coinfecciones por ambos agentes fueron menos frecuentes (5%). Las infecciones por *Salmonella* ocurrieron esporádicamente (1,2%). ETEC no pudo ser aislada a partir de ningún ternero. Al comparar ambos sistemas productivos, la frecuencia de detección de RV fue significativamente mayor en los terneros de cría para carne ($p < 0,01$) (Bellinzoni *et al.*, 1990).

2.5.4 Etiología de la bacteriemia y septicemia en terneros neonatos

Durante muchos años *E. coli* ha sido considerada como la principal bacteria responsable de la septicemia neonatal de los terneros (Aldridge *et al.*, 1993; Radostitis *et al.*, 2007). Sin embargo, otros agentes bacterianos como *Salmonella* spp. (Aldridge *et al.*, 1993; Radostitis *et al.*, 2007; Fecteau *et al.*, 2009), *Campylobacter* spp. (Hariharan *et al.*, 1992; Radostitis *et al.*, 2007), *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp. (Aldridge *et al.*, 1993; Fecteau *et al.*, 2009), *Pasteurella* spp., *Streptococcus* spp. (Aldridge *et al.*, 1993; Radostitis *et al.*, 2007) y *Listeria monocytogenes* (Glock y Miller, 1972; Radostitis *et al.*, 2007) pueden estar implicados en las infecciones sistémicas de los terneros neonatos, aunque suelen hallarse con mucha menor frecuencia (Radostitis *et al.*, 2007; Fecteau *et al.*, 2009).

Un estudio realizado en la Universidad de Colorado (EEUU) evaluó 25 terneros menores a 14 días de vida. La signología clínica observada incluyó deshidratación (17 terneros), tendencia al decúbito (14), letargia (12), debilidad (8), taquipnea (13), taquicardia (12), hipertermia (6) o hipotermia (6). Los hallazgos clínicos indicativos del compromiso de un sistema orgánico incluyeron signología respiratoria (12), diarrea (11) y signos nerviosos (7), entre otros. A partir de estos animales se obtuvieron muestras de sangre *antemortem* ($n = 10$), fluidos corporales ($n = 8$) y especímenes de tejido ($n = 35$) recolectados durante las necropsias ($n = 18$). Los cultivos bacteriológicos positivos se obtuvieron a partir de sangre (70%, 7/10), fluidos corporales (87,5%, 7/8) y especímenes de tejido (82,8%, 29/35). En 7 muestras de sangre se identificaron 8 aislamientos bacterianos, entre ellos *E. coli* (50%, 4/8), *Salmonella* y *Clostridium* spp. en la misma muestra (25%, 2/8), *Hafnia* spp. (12,5%, 1/8) y *Streptococcus* spp. no-hemolítico (12,5%, 1/8). En los 3 terneros con hemocultivo negativo se pudieron aislar bacterias de los órganos. En 7 muestras de fluidos corporales se obtuvieron 10 aislamientos, de los cuales *E. coli* representó el 70% (7/10) de los mismos. Las bacterias gramnegativas predominaron (90%, 28/31) en los

especímenes de tejido. No obstante, *E. coli* fue la bacteria de mayor importancia ya que representó el 68% (21/31) de los aislamientos del 67% (12/18) de los terneros necropsiados. *Salmonella* spp. también se aisló en más de un ternero (17%, 3/18). Las infecciones polimicrobianas se observaron en el 28% (5/18) de los terneros. De los 6 terneros evaluados simultáneamente por hemocultivo y cultivo de tejido, sólo 2 terneros resultaron positivos para ambos tipos de muestra. Es interesante destacar que 19 de los 25 terneros habían recibido tratamiento previo con antibióticos (Aldridge *et al.*, 1993).

En otra investigación realizada en Canadá, se hicieron hemocultivos de terneros (1-38 días de vida) con septicemia ($n = 65$). Los animales comúnmente manifestaron diarrea, decaimiento y deshidratación. En el 40% (26/65) de las muestras se obtuvieron aislamientos bacterianos y el 80% fueron bacterias gramnegativas. *E. coli* fue identificada en el 65% (17/26) de los hemocultivos positivos, seguida en orden de frecuencia por *Streptococcus* grupo D (11,5%, 3/26), *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* (7,7%, 2/26) y otras bacterias. Los casos reportados en este estudio demuestran un predominio de las bacterias gramnegativas y especialmente *E. coli* como causa de septicemia en terneros (Hariharan *et al.*, 1992).

En California (EEUU) se realizó una investigación durante dos períodos (1991 y 1993) y se estimó la prevalencia de bacteriemia en 190 terneros (1-19 días de vida) severamente enfermos, los cuales manifestaban decaimiento y diarrea. Además, se identificaron las bacterias involucradas en dichos casos. El diagnóstico de bacteriemia por hemocultivo se confirmó en el 31% (28/90, 1991) y 24% (19/79, 1993) de los terneros enfermos y en ninguno de los terneros sanos (0/21). Las bacterias aisladas incluyeron *E. coli* (51%), bacterias entéricas gramnegativas (25,5%) (*Klebsiella* spp. y *Salmonella* spp.), bacterias anaerobias gramnegativas (5,9%) (*Bacteroides* spp.), cocos grampositivos (11,8%) (*Staphylococcus* spp.) y bacilos grampositivos (5,9%) (*Bacillus* spp. y *Listeria* spp.). Las bacteriemias de origen polimicrobiano fueron muy poco frecuentes. La edad promedio de los terneros enfermos fue significativamente menor en aquellos con hemocultivo negativo (5,5 días) con respecto a los terneros con hemocultivo positivo (7,5 días) ($p = 0,004$). La concentración promedio de IgG sérica fue significativamente menor ($p = 0,0001$) en los terneros con bacteriemia (1,15 mg/ml) en comparación con aquellos con hemocultivo negativo (3,1 mg/ml). Asimismo, la tasa de mortalidad fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) para el grupo de terneros con bacteriemia en relación al grupo con hemocultivo negativo (57,4% vs. 15,1%). La bacteriemia constituyó un hallazgo frecuente y *E. coli* fue la principal bacteria involucrada (Fecteau *et al.*, 1997).

En Turquía se realizó un estudio para evaluar las bacterias patógenas y aerobias en terneros con septicemia. Se recolectaron muestras de sangre a partir de terneros (0-7 días de vida) con septicemia ($n = 90$) y sanos ($n = 20$). Los animales incluidos en el estudio mostraron signos clínicos de septicemia, entre ellos ausencia del reflejo de succión, letargia, debilidad, anorexia, decúbito, hipotermia o hipertermia y diarrea. Sin embargo, los signos más destacados fueron la diarrea, deshidratación e hipotermia. En la mayoría de las muestras (89/90) se lograron aislar bacterias y las más importantes fueron *E. coli* (63%), *Streptococcus* β hemolítico (15,7%), *Saphylococcus aureus* (10,1%) y *Klebsiella* spp. (5,6%). En todas las muestras se aisló un solo microorganismo y *E. coli* fue la bacteria identificada con mayor frecuencia (Kireççi *et al.*, 2010).

En Argentina hay poca información con respecto a la importancia de los diferentes géneros bacterianos que causan septicemia neonatal en terneros. En un estudio retrospectivo realizado en la EEA Balcarce (INTA), se evaluaron terneros ($n = 169$) de 1-7 días de vida. En el 29% de los casos (49/169) se aislaron agentes infecciosos y los de mayor frecuencia incluyeron *E. coli* (13), *Brucella abortus* (6), *Trueperella pyogenes* (4) y *Salmonella* spp. (4). El aislamiento en pureza de las bacterias mencionadas y la presencia de lesiones histológicas en varios tejidos fueron concluyentes para arribar al diagnóstico de septicemia (Morrell *et al.*, 2008).

3. Rotavirus

3.1 Generalidades y estructura del virión

RV pertenece a la familia *Reoviridae* (Hoshino y Kapikian 2000; Estes y Kapikian, 2007) y es una de las principales causas de enteritis aguda y diarrea en diferentes especies de animales y humanos (Murphy *et al.*, 1999; Estes y Kapikian, 2007; Papp *et al.*, 2013). Los RV del grupo A (RVA) son los más importantes, tanto desde el punto de vista médico como veterinario (Midgley *et al.*, 2012), ya que tienen una elevada prevalencia y son patógenos (Papp *et al.*, 2013) capaces de causar diarrea en bovinos, ovinos, cabras, cerdos, guanacos, equinos, aves *Galliformes*, ratones de laboratorio y otros animales (Parreño *et al.*, 2001; Galindo-Cardiel *et al.*, 2011; Garaicoechea *et al.*, 2011; MacLachlan y Dubovi, 2011; Alkan *et al.*, 2012). En el año 1969, Mebus y col. lograron reproducir la diarrea en terneros gnotobióticos y privados de calostro mediante la utilización de filtrados de MF libres de bacterias, los cuales habían sido obtenidos de casos naturales de diarrea en terneros (Mebus *et al.*, 1969). Posteriormente, se confirmó que el virus presente en los filtrados de MF correspondía a RV (Torres-Medina *et al.*, 1995). Desde entonces, RV es considerado como una de las principales causas de diarrea en terneros (Woode, 1978; Pastoret *et al.*, 1984; Saif *et al.*, 1994; Dhama *et al.*, 2009) y tiene una amplia distribución en los rodeos bovinos de todo el mundo (Woode, 1978; Scott *et al.*, 2004),

alcanzando prevalencias puntuales que varían del 10 al 45% en terneros con diarrea (Falcone *et al.*, 1999; García *et al.*, 2000; Garaicoechea *et al.*, 2006; Herrera-Luna *et al.*, 2009; Swiatek *et al.*, 2010).

Los viriones carecen de envoltura lipídica, presentan un diámetro de 75-100 nm y tienen una cápside de simetría icosaédrica. Esta última está formada por tres cubiertas proteicas y concéntricas que rodean el genoma viral, compuesto por 11 segmentos de ARNdc (Desselberger, 2000; Ward *et al.*, 2006; Estes y Kapikian, 2007). El virión tiene apariencia de rueda (*rota* en latín) cuando se observa por microscopía electrónica (ME) (Fig. 3.1) y esta característica distintiva le dio el nombre de *rotavirus*. Una propiedad importante del virus es el aumento de su infectividad en los cultivos celulares luego del tratamiento con enzimas proteolíticas (tripsina o pancreatina), ya que las mismas escinden el polipéptido de las espículas virales (Estes y Kapikian, 2007). Los viriones se liberan desde la célula huésped por lisis o mediante un transporte vesicular no clásico que ocurre en las células epiteliales polarizadas (Estes, 1996; Estes, 2001).

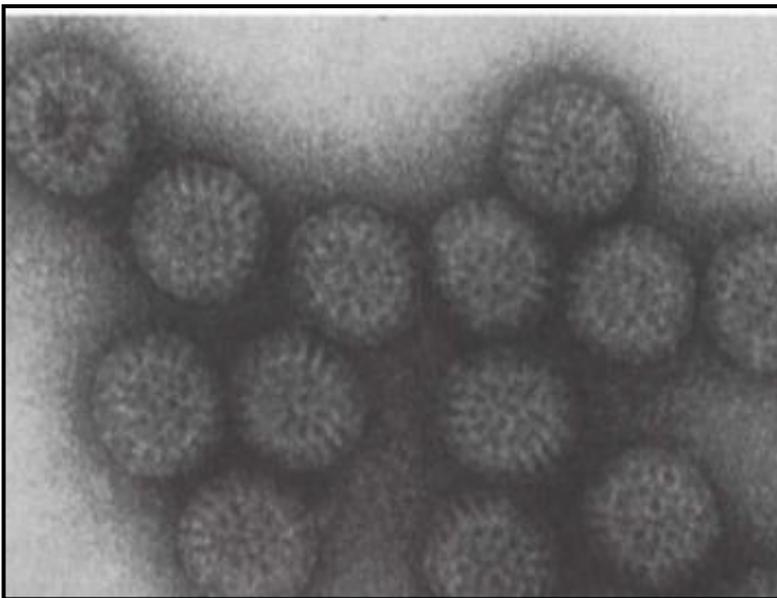


Fig. 3.1. Rotavirus simio (SA11) visualizado por microscopía electrónica de contraste negativo. Fuente: *Veterinary Virology* (Murphy *et al.*, 1990).

RV presenta características estructurales que lo hacen altamente infectivo y le confieren una elevada resistencia frente a la inactivación fisicoquímica. El virus permanece estable dentro de un amplio rango de pH (3-9) y es capaz de conservar su infecciosidad durante meses en ambientes húmedos, con temperaturas de 4-20 °C y en presencia de iones Ca^{++} . Estos últimos estabilizan la cápside externa y le permiten al virión sobrevivir en distintas superficies, contribuyendo a su rápida dispersión (Estes, 1996; Kapikian y Chanock, 1996; Estes, 2001). En este sentido, una investigación demostró que las heces de cerdo, positivas a RVA y conservadas

a 10 °C durante 32 meses, mantuvieron la integridad del genoma viral (36% de las muestras) y su infectividad en cultivo celular (45% de las muestras con genoma intacto) (Ramos *et al.*, 2000). La MF del bovino puede mantener la capacidad infectiva del virus durante 7-9 meses a temperatura de habitación (Woode, 1978).

El genoma viral está compuesto por 11 segmentos génicos que codifican 6 proteínas estructurales (VP) (VP1-VP4, VP6 y VP7) y 5 o 6 proteínas no-estructurales (NSP) (NSP1-NSP6) (Hoshino y Kapikian, 2000; Matthijnsens *et al.*, 2008b; Papp *et al.*, 2013) (Fig. 4.1). Todos los segmentos génicos codifican una sola proteína (monocistronicos), a excepción del segmento 11 que es bicistronico. Los tamaños de estos segmentos varían de 660 a 3300 pb, mientras que las proteínas tienen pesos moleculares de 12 a 125 kDa (Ward *et al.*, 2006). El ARN genómico se extrae fácilmente de las partículas virales presentes en la MF. Luego, se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y se visualiza con una tinción argéntica. El patrón de migración de los segmentos genómicos mediante esta técnica se denomina electroferotipo (Kapikian y Chanock, 1996; Estes, 2001; Ward *et al.*, 2006).

La cubierta más interna del virus (*core*) está constituida por 120 moléculas de la proteína VP2 (Fig. 4.1), las cuales se arreglan formando dímeros (Ward *et al.*, 2006; Estes y Kapikian, 2007). El *core* contiene el genoma viral en su interior e interacciona con las proteínas VP1 y VP3, formando un complejo enzimático que participa en los procesos de transcripción y replicación. La proteína VP1 es una polimerasa dependiente de ARN, VP2 actúa como una proteína de empaquetamiento que se une al ARN y VP3 posee actividad guanidiltransferasa y metiltransferasa (Kapikian y Chanock, 1996; Hoshino y Kapikian, 2000; Ward *et al.*, 2006; Estes y Kapikian, 2007).

La cubierta intermedia (o cápside interna) está constituida por 780 moléculas de la proteína VP6, la cual se organiza formando unos 260 trímeros por virión (Fig. 4.1). Esta proteína representa el 50% de la masa total del virus y es altamente inmunogénica (Estes y Kapikian, 2007). En su estructura hay un Ag principal que se detecta con las técnicas inmunológicas de diagnóstico (Matthijnsens *et al.*, 2008b). La proteína VP6 cumple una función muy importante, ya que interacciona con las proteínas de la cápside externa y del *core*, manteniendo la integridad estructural de la cápside (Kapikian y Chanock, 1996; Estes, 2001; Estes y Kapikian, 2007). El *core* (VP2) y la cubierta intermedia (VP6) forman una estructura de doble cubierta conocida como VLPs (*virus like particles*) (Estes y Kapikian, 2007).

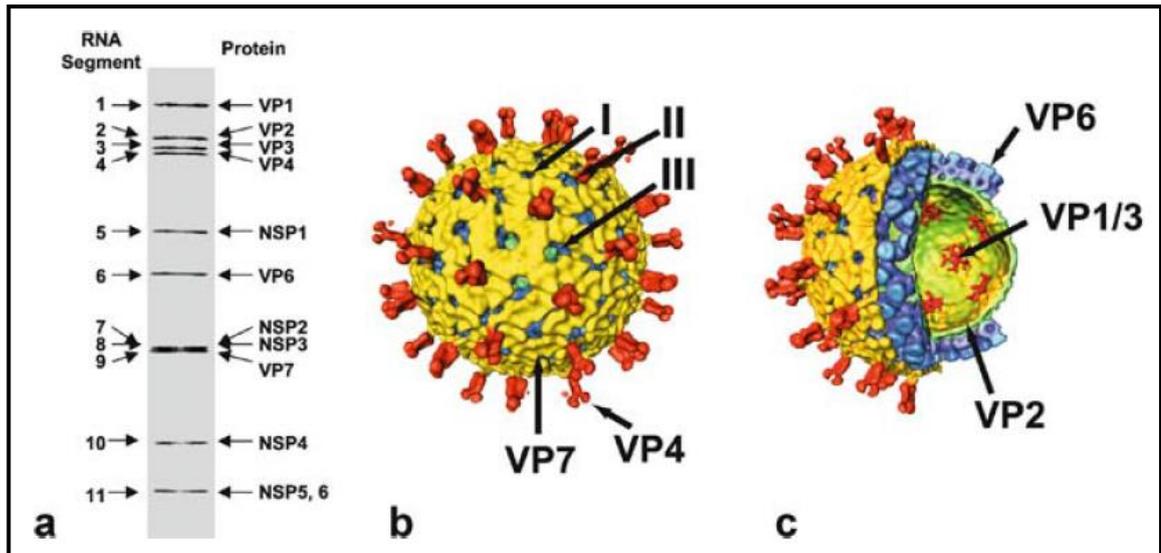


Fig. 4.1. **a** Electroforesis en gel de poliacrilamida mostrando los segmentos génicos de ARN y su correspondencia con las proteínas que codifican. Los segmentos de ARN se numeran según el orden de migración en el gel y sus números se indican del lado izquierdo, mientras que las proteínas se indican del lado derecho del gel. **b** Representación de la superficie de una partícula viral madura con las 3 cubiertas (TLP, del inglés *triple-layered particle*). Las flechas indican los 3 tipos de canales acuosos (I, II y III). Las espículas de VP4 están coloreadas en rojo y la glicoproteína VP7 se indica en amarillo. **c** Corte de sección de una TLP mostrando las características internas. La proteína VP6 de la cubierta intermedia se representa en color azul y la proteína VP2 del *core* en color verde. El complejo de transcripción (VP1 y VP3) se muestra de color rojo (forma de flor). Este complejo se une al interior de la cubierta de VP2 a nivel de los ejes de 5 pliegues del icosaedro, justo por debajo de los canales de tipo I. Fuente: Pesavento *et al.*, 2006.

La cubierta externa (cápside externa) está constituida por las proteínas VP4 y VP7 (Fig. 4.1) (Hoshino y Kapikian 2000). Los dímeros de la proteína VP4 forman 60 espículas (10-12 nm de largo), lo cual representa unas 120 copias de esta proteína y constituye sólo el 1,5% de la masa viral (Pesavento *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2006; Estes y Kapikian, 2007). Las espículas se proyectan desde la cápside externa y rodean a los ejes de cinco pliegues del icosaedro. Estas espículas tienen una estructura particular, ya que presentan dos dominios globulares distales en la cabeza, un cuerpo central y un dominio globular interno (Pesavento *et al.*, 2006). VP7 es la segunda proteína más abundante del virión (30% de la masa viral) (Estes, 1996) y constituye la mayor proporción de la cápside externa (Hoshino y Kapikian, 2000; Ward *et al.*, 2006). Esta proteína se arregla formando unidades triméricas e interacciona con las puntas de los trímeros de VP6 (Estes y Kapikian, 2007). A su vez, el dominio globular interno de la espícula (VP4) atraviesa la cubierta de VP7 e interacciona con dos moléculas de esta última a nivel de los canales acuosos de tipo II (Estes y Kapikian, 2007). Luego, la espícula se ancla a seis moléculas de VP6 que rodean a los canales acuosos (Ward *et al.*, 2006; Estes y Kapikian, 2007).

La proteína VP4 es el producto del segmento génico 4, no presenta glicosilación (Estes, 1996), tiene la capacidad de producir hemoaglutinación y permite la adhesión del virus a la

célula. Esta proteína puede ser escindida por la acción de enzimas proteolíticas como la tripsina o pancreatina, generando dos subunidades que se denominan VP5* y VP8* (Fig. 5.1) (Estes y Cohen, 1989; Estes, 1996; Estes y Kapikian, 2007). El dominio globular de la espícula está constituido por VP8*, mientras que el resto del cuerpo de la espícula está formado por VP5* (Estes y Kapikian, 2007). La escisión enzimática de VP4 aumenta la infectividad, ya que facilita la penetración del virus a las células (Estes y Cohen, 1989; Estes, 1996; Estes y Kapikian, 2007). Además, la proteína VP4 restringe la replicación viral a ciertos cultivos celulares, determina la capacidad de las cepas para formar placas de lisis y establece el tamaño de las mismas (Mattion *et al.*, 1992; Mattion *et al.*, 1994; Arias *et al.*, 1996). Existen dos sitios conservados en donde puede ocurrir la escisión proteolítica de VP4 (arginina en 241 y 247) (Fig. 5.1), aunque el sitio preferido se ubica en la posición 247 (Fig. 5.1). Algunas cepas tienen un tercer sitio de escisión, representado por un residuo de arginina en la posición 231 (Estes y Cohen, 1989; Estes, 1996). La proteína VP4 está constituida por 776 aminoácidos (aa) en las cepas de origen animal y por 775 aa en las cepas humanas, ya que estas últimas han perdido un residuo en la posición 136 correspondiente a las cepas de origen animal. Por lo tanto, la subunidad VP8* de las cepas humanas es más corta en un solo aa (Estes y Cohen, 1989; Estes, 1996).

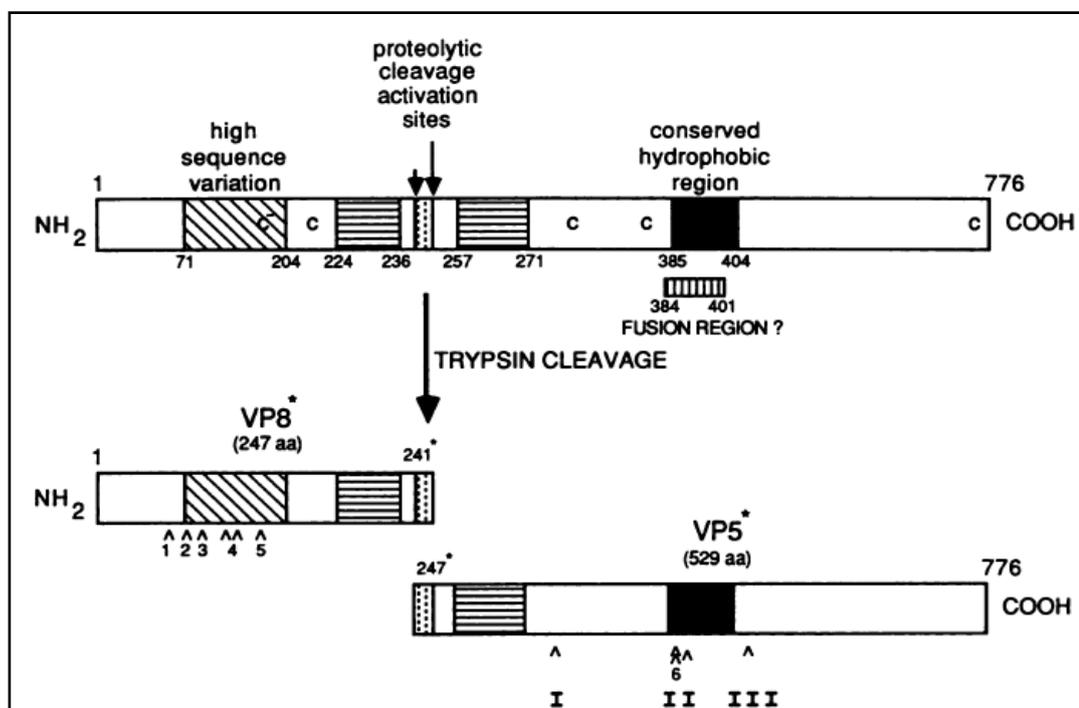


Fig. 5.1. Características de VP4. Representación esquemática de las propiedades estructurales y antigénicas de VP4. La misma se basa en los análisis de secuencias nucleotídicas de diferentes cepas virales y mutantes seleccionadas por escapar a la neutralización con AcMs. Símbolos: regiones con secuencias conservadas entre diferentes cepas virales (rectángulo con líneas horizontales); regiones con la mayor variación en VP8* (rectángulo con líneas diagonales); región de fusión (rectángulo con líneas verticales); ↓↓ sitios de escisión para la tripsina. Cisteínas conservadas (C) en los aa 215, 317, 379 y 773. La localización de los epitopes neutralizantes en VP8* se muestran con ^ y un número de 1 a 6. Los epitopes de VP5* se indican con ^ y un número de I a III. Se muestra el péptido removido por escisión enzimática en los aa 241 y 247 (rectángulos con puntos). La numeración de las posiciones se basa en la proteína de 776 aa de las cepas SA11, 4fm, RRV y Bo/486. Fuente: Estes y Cohen, 1989.

La proteína VP4 es inmunogénica en animales y niños, induce la formación de Acs neutralizantes y genera inmunidad protectora (Estes y Cohen, 1989; Estes, 1996; Hoshino y Kapikian, 2000). Esta proteína es altamente variable y porta epítopes neutralizantes específicos. Dicha variabilidad permite clasificar a los RVA en genotipos o serotipos (tipos P) (Hoshino y Kapikian, 2000; Estes y Kapikian, 2007). Los residuos de aa en la superficie de VP8* son altamente variables entre genotipos y, probablemente, reflejan una presión de selección para la diversidad ejercida por el sistema inmune del hospedador (Dormitzer *et al.*, 2002). Las comparaciones de las secuencias del segmento génico 4, en búsqueda de regiones con diversidad entre cepas de diferentes serotipos, indican que las homologías no se distribuyen regularmente a lo largo del gen (Estes y Cohen, 1989). La mayor variabilidad se observa en la región comprendida entre los aa de las posiciones 71 y 204 de la subunidad VP8* (Fig. 5.1) (Estes y Cohen, 1989; Estes, 1996). Sin embargo, se demostró que los principales sitios antigénicos, específicos de serotipo, se encuentran en las regiones ubicadas entre los aa 84 a 108 (Estes, 1996) y 102 a 149 de la subunidad VP8* (Larralde *et al.*, 1991; Larralde y Gorziglia, 1992). También hay otra región variable que se ubica entre las posiciones 578 a 608 (Estes y Cohen, 1989).

La topografía antigénica de VP8* se ha investigado exhaustivamente. La secuenciación de cepas mutantes que escapan a la neutralización con anticuerpos monoclonales (AcMs) ha permitido identificar los aa involucrados en la neutralización homóloga y heteróloga. La VP8* contiene, predominantemente, epítopes específicos de serotipo y se han identificado 5 sitios (Fig. 5.1) (Estes y Cohen, 1989). Más recientemente, los experimentos con mutantes que escapan a la neutralización indican que VP8* contiene varios epítopes interrelacionados, los cuales son reconocidos por Acs neutralizantes. Las mutaciones que permiten el escape a la neutralización en las cepas hemoaglutinantes se distribuyen y agrupan en la superficie accesible del corazón de VP8*. Actualmente, los sitios antigénicos se denominan 8-1 (residuos en las posiciones 100, 146, 148, 150, 188, 190, 194), 8-2 (180 y 183), 8-3 (114, 116, 132, 133, 135, 136), 8-4 (87, 88, 89) (Dormitzer *et al.*, 2002).

La proteína VP4 también tiene regiones conservadas que están implicadas en la neutralización. Los AcMs de reacción cruzada reconocen sitios de VP5* (Estes y Cohen, 1989; Estes, 1996), los cuales están agrupados en los aa 306, 388, 393, 434 y 440 (Estes y Cohen, 1989). Estas posiciones se basan en la numeración utilizada para las cepas de origen animal. La subunidad VP5* también tiene una región hidrofóbica (aa 384-401) (Fig. 5.1) que es común a varios serotipos de VP4 (Estes y Cohen, 1989).

La proteína estructural VP7 es una glicoproteína y está codificada por el segmento génico 7 (cepa SA11), 8 (cepa UK) o 9 (cepa RRV), dependiendo de la cepa. Esta proteína tiene características muy importantes dado que participa en la adhesión inicial del virus a la célula, es altamente inmunogénica e induce la formación de Acs neutralizantes, siendo el principal Ag de la cubierta externa (Estes y Cohen, 1989). La secuencia nucleotídica de VP7 tiene un marco de lectura abierta (ORF) de 326 aa (Estes y Cohen, 1989) y existen dos regiones con aa hidrofóbicos (H1 y H2) (Fig. 6.1). Estas regiones junto a la secuencia ITG en el residuo 60 permiten dirigir y retener la proteína VP7 en el retículo endoplásmico (Estes y Cohen, 1989; Maass y Atkinson, 1994). El dominio H1 está comprendido entre los aa de las posiciones 6 y 23, mientras que el dominio H2 se ubica entre los aa de las posiciones 32 y 48 (Fig. 6.1). Esta primera porción de VP7 representa un péptido señal que se separa en el sitio de clivaje. Por lo tanto, la proteína madura comienza a partir del aa ubicado en la posición 51 y los análisis de secuencias demuestran la presencia de un residuo de glutamina (Q) en dicha ubicación (extremo amino-terminal), el cual está muy conservado entre las cepas de RV (Estes y Cohen, 1989).

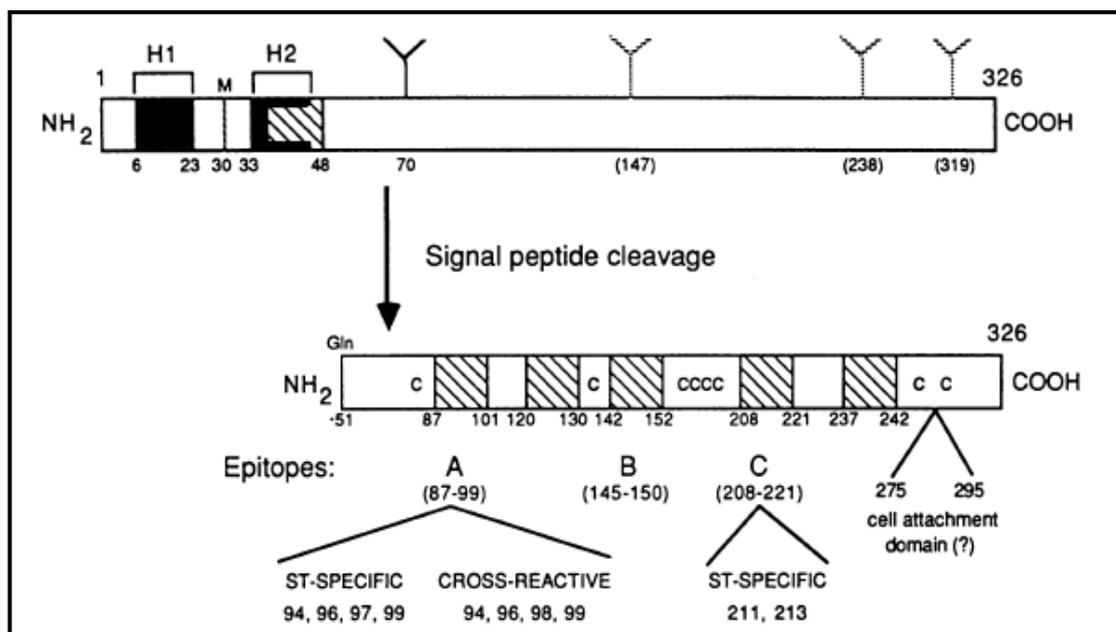


Fig. 6.1. Características de la proteína VP7. La figura muestra una representación esquemática de las propiedades estructurales y antigénicas de VP7, basadas en los análisis de secuencias de cepas virales y mutantes que escapan a la neutralización con AcMs. Se indican las regiones hidrofóbicas conservadas del extremo amino terminal (H1 y H2), la segunda metionina (M) dentro de fase, el sitio de glicosilación utilizado por la cepa SA11 (Y), los sitios potenciales de glicosilación encontrados en otras cepas virales (Y), los residuos conservados de cisteína (C) y el sitio de escisión del péptido señal. En el diagrama debajo se muestran las regiones con variación en las secuencias (cuadrados con líneas diagonales), el sitio propuesto para la adhesión celular (aa 275 a 295) y los sitios con cambios de aa en las cepas mutantes, las cuales fueron seleccionadas luego de su reactividad con AcMs neutralizantes específicos de serotipo y de reacción cruzada. Fuente: Estes y Cohen, 1989.

La proteína VP7 tiene de uno a tres sitios potenciales para la N-glicosilación con residuos de oligosacáridos (alto contenido de manosa), aunque la glicosilación no es esencial para la infectividad del virus. La mayoría de las cepas de origen bovino (incluida la cepa de referencia UK), tienen un sitio de glicosilación en el aa de la posición 69. Sin embargo, este sitio no está presente en las cepas bovinas NCDV y RF. No obstante, estas cepas y muchas otras contienen sitios adicionales de glicosilación en los aa de las posiciones 238 y 318. Los carbohidratos pueden tener un rol importante al influir en la exposición de los determinantes antigénicos de VP7 (Estes y Cohen, 1989). Por otra parte, la mayoría de las cepas bovinas tienen prolinas en la posición 75 de una región hipervariable (posiciones 65-79) y en la posición 279 de una región más conservada. En estos sitios se producen enlaces con iones de Ca^{++} , los cuales participan en la estabilización de la cápside externa (Gajardo *et al.*, 1997). Las mutaciones en las prolinas son importantes debido a que cambian el sentido de la estructura terciaria de las proteínas. La cepa bovina de referencia UK presenta 11 prolinas conservadas, 8 cisteínas y 3 sitios posibles de glicosilación (aa 69, 238 and 318) (Fig. 29.2).

La proteína VP7 posee nueve regiones lineales que son altamente variables. Sin embargo, sólo cinco de ellas estarían presentes en la VP7 madura y tres regiones participan en la neutralización, según el mapeo de secuencias en las cepas mutantes que escapan a la neutralización. Los epitopes neutralizantes de mayor importancia se encuentran en las regiones A (aa 87-101), B (aa 142-152) y C (aa 208-221) (Fig. 6.1). Las cepas con diferencias antigénicas o en sus secuencias de aa dentro las regiones hipervariables (principalmente A y C) se clasifican como serotipos y genotipos (tipos G) diferentes. Además, estas cepas no presentan neutralización cruzada en los ensayos *in vitro* (Estes y Cohen, 1989; Estes, 1996; Estes, 2001). Los mapeos de cepas que escapan a la neutralización con AcMs, sean estos específicos de cepa o de reacción cruzada entre diferentes serotipos, permitieron localizar epitopes de reacción cruzada (región A) y epitopes específicos de cepa (regiones A y C). La región C sería el sitio antigénico inmunodominante (Estes y Cohen, 1989).

Actualmente, las regiones antigénicas de VP7 se denominan 7-1a (residuos 87 a 101 y 291), 7-1b (residuos 208 a 221, 189 a 190 y 233 a 242) y 7-2 (residuos 142 a 152). Estas regiones son equivalentes con aquellas que anteriormente se denominaban A (residuos 87 a 101) y D (residuo 291) (7-1a); C (residuos 208 a 221), E (residuos 189 y 190) y F (residuos 233 a 242) (7-1b); B (residuos 142 a 152) (7-2) (Phan *et al.*, 2007; Matthijnsens *et al.*, 2010).

3.2 Técnicas de diagnóstico

El diagnóstico de la infección por RVA se basa en la demostración de la partícula viral, la detección de Ag (Cilli y Castrucci, 1981) o la identificación de su genoma (MacLachlan y Dubovi, 2011). Las muestras de rutina para realizar el diagnóstico incluyen MF de terneros vivos o contenido intestinal (CI) de animales necropsiados, las cuales deberían recolectarse dentro de las primeras 24 h de iniciada la diarrea para tener mayor éxito en el diagnóstico (Janke, 1989).

Las técnicas utilizadas para la demostración del virus o la detección de Ag incluyen: ME (Brandt *et al.*, 1981; Athanassious *et al.*, 1994), microscopía inmunoeléctrica (MIE) (Brandt *et al.*, 1981; MacLachlan y Dubovi, 2011), inmunofluorescencia (IFD) (Cilli y Castrucci, 1981), aislamiento viral en cultivo celular (Christy *et al.*, 1990), aglutinación en placa con partículas de látex (Al-Yousif *et al.*, 2001), inmunocromatografía (IC) (Klein *et al.*, 2008) y ELISA (Brandt *et al.*, 1981; Athanassious *et al.*, 1994; Al-Yousif *et al.*, 2001; MacLachlan y Dubovi, 2011). En algunos países se utilizan las técnicas de IFD e inmunohistoquímica (IHQ) en cortes de tejido intestinal para el diagnóstico de rutina.

La detección del genoma viral se realiza mediante la extracción directa del ARN a partir de las heces. Posteriormente, se puede optar por la amplificación de algún segmento génico utilizando transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Chinsangaram *et al.*, 1993; MacLachlan y Dubovi, 2011) o por la detección del genoma viral mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) (Hammami *et al.*, 1990). Las técnicas más utilizadas en Argentina para el diagnóstico de RVA incluyen la IC y el ELISA (Cornaglia *et al.*, 1992). En cambio, para la investigación de genotipos se han desarrollado protocolos de RT-PCR semi-anidada y múltiple (Garaicoechea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012).

3.3 Clasificación y caracterización de RV

Los RVs tienen tres especificidades antigénicas de importancia que se denominan grupo, subgrupo y serotipo (Hoshino y Kapikian, 2000). La especificidad de grupo está determinada, principalmente, por la proteína VP6 (Hoshino y Kapikian, 2000) y actualmente existen un total de 8 grupos (A-H) (Matthijnsens *et al.*, 2012). Los grupos A, B y C se encuentran en animales y humanos, mientras los grupos D, E, F y G sólo se han identificado en animales (Estes y Kapikian, 2007; Matthijnsens *et al.*, 2008b). Los virus de un mismo grupo son capaces de realizar reordenamiento genético (*reassortment*), aunque esto no ocurre entre virus de diferentes grupos (Estes y Kapikian, 2007). Cada serogrupo incluye aquellas cepas de RV que comparten antígenos (Ags) de reacción cruzada en la proteína VP6, los cuales pueden detectarse por métodos serológicos como ELISA, IF y MIE (Estes y Kapikian, 2007).

Dentro del grupo A existen diferentes subgrupos (SG) (Desselberger, 2000) y la especificidad de cada SG está determinada por la reactividad de la proteína VP6 frente a dos AcMs (Hoshino y Kapikian, 2000). De esta manera quedan establecidas las especificidades SGI, SGII, SGI + II y SG no-I/no-II (Desselberger, 2000; Matthijssens *et al.*, 2008b). La evaluación de los SG se ha utilizado para caracterizar las propiedades antigénicas de las cepas de RV humanas durante los estudios epidemiológicos (Hoshino y Kapikian, 2000). Más recientemente, mediante técnicas moleculares, sólo se han podido distinguir dos grupos (genogrupos) en las cepas de RVA humanas (genogrupo I: SGI; genogrupo II: SGII, SGI + II y SG no-I/no-II) (Matthijssens *et al.*, 2008b).

Los serotipos están determinados por las proteínas VP7 y VP4, las cuales inducen la formación de Acs neutralizantes y específicos de manera independiente (Hoshino y Kapikian, 2000; Pérez-Vargas *et al.*, 2006; Estes y Kapikian, 2007). Las características antigénicas o genéticas de las proteínas VP7 y VP4 se utilizan para clasificar a las cepas de RVA en tipos G (VP7 es una glicoproteína) y tipos P (VP4 es sensible a proteasa), respectivamente (Santos y Hoshino, 2005; Pérez-Vargas *et al.*, 2006; Estes y Kapikian, 2007). Las técnicas serológicas determinan los serotipos y las técnicas moleculares los genotipos (Estes y Kapikian, 2007). Con respecto a VP7 existe una correspondencia entre el genotipo y el serotipo, mientras que esta relación es menos clara para VP4. Sin embargo, la región variable de VP8* (entre los aa 71-204) se utiliza para definir los epitopes específicos del tipo P (Estes y Kapikian, 2007). De esta manera queda establecido un sistema de clasificación binario (tipos G y P), similar al del virus de la influenza, el cual permite designar las especificidades neutralizantes de VP7 y VP4 (Hoshino y Kapikian 2000; Estes y Kapikian, 2007; Papp *et al.*, 2013). Los genes que codifican estos dos Acs neutralizantes pueden segregarse (reordenarse) de manera independiente. Por lo tanto, es posible que un aislamiento viral tenga Acs neutralizantes heterólogos, tanto de VP7 como de VP4 (Estes y Kapikian, 2007).

La clasificación de RV en serotipos se determina de manera independiente según la variación antigénica de VP7 y VP4 (Hoshino y Kapikian, 2000). La determinación de los serotipos puede realizarse por seroneutralización cruzada (serotipos G) y ELISA de captura con AcMs específicos de serotipo (serotipos G y P). Los análisis con AcMs dirigidos hacia las proteínas VP7 y VP4 demostraron que las mismas portan epitopes que son responsables de evocar Acs neutralizantes y de reacción cruzada (Hoshino y Kapikian, 2000). La expresión de dichos epitopes depende de las combinaciones de VP7 y VP4 que conforman la cápside (Estes y Kapikian, 2007). La seroneutralización es por definición el único método que determina la

especificidad neutralizante (serotipo) de VP7 y VP4 (Hoshino y Kapikian, 2000). Esta técnica permite evaluar la reactividad del virus frente a sueros hiperinmunes preparados en animales seronegativos. Estos ensayos de neutralización pueden basarse en la reducción de placas o de focos fluorescentes (Estes y Kapikian, 2007) y los mismos miden la reactividad de los Acs frente a los Ags neutralizantes de VP7 y VP4. Sin embargo, la reactividad está dirigida fundamentalmente hacia VP7 (Hoshino y Kapikian, 2000; Estes y Kapikian, 2007). En algunos casos hay cepas de RV que no reaccionan claramente en los ensayos de neutralización recíproca con sueros hiperinmunes. Usualmente, esto se debe a que los virus evaluados poseen diferentes formas inmunológicas de VP4 (Estes y Kapikian, 2007).

En los modelos animales, la especificidad del serotipo de RV juega un rol importante en la protección frente a la enfermedad o reinfección por una cepa virulenta de desafío (Hoshino y Kapikian, 2000). En general, las respuestas serológicas frente a los epitopes neutralizantes de RV son mucho más restringidas en los animales inmunológicamente vírgenes (ej. animales gnotobióticos) con respecto a las desarrolladas por animales con experiencia inmunológica (ej. animales adultos), los cuales posiblemente han estado infectados con RV en diferentes momentos. La reactividad también ha sido evaluada con sueros hiperinmunes desarrollados en cobayos. En estos últimos, el mayor nivel de actividad neutralizante se observa frente al virus homólogo, con un nivel de actividad neutralizante bajo o indetectable frente a ciertos virus heterólogos (Hoshino y Kapikian, 2000). En animales gnotobióticos inmunizados en forma oral o parenteral con RV, las respuestas de Acs neutralizantes fueron mayores frente a las proteínas VP7 y VP4 del virus homólogo utilizado en la vacuna. Luego estas respuestas fueron mayores frente a los virus que estaban relacionados por VP7 o VP4 con la cepa vacunal y, finalmente, fueron menores para los virus que no estaban relacionados (Hoshino y Kapikian, 2000).

3.4 Genotipos de RVA en bovinos

Una metodología reconocida para tipificar VP7 y VP4 se basa en la utilización de RT-PCR semi-anidada o anidada con *primers* específicos de tipo (Gentsch *et al.*, 1996; Falcone *et al.*, 1999; Alfieri *et al.*, 2004; Reidy *et al.*, 2006; Monini *et al.*, 2008). La misma permite identificar los grupos génicos (o alelos) que codifican VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P) (Hoshino y Kapikian, 2000). Estos métodos son una herramienta epidemiológica de mucha utilidad (Gentsch *et al.*, 1996; Reidy *et al.*, 2006), ya que permiten una genotipificación rápida y completa (Reidy *et al.*, 2006; Monini *et al.*, 2008) de las cepas de campo presentes en la MF o aisladas a partir de cultivos celulares (Falcone *et al.*, 1999; Hoshino y Kapikian, 2000; Alfieri *et al.*, 2004). Además, estas técnicas han resuelto algunas limitantes de las técnicas serológicas.

En la naturaleza se produce la deriva antigénica por acumulación de mutaciones puntuales en la proteína VP7 y esto hace que sea necesario utilizar muchas combinaciones de AcMs para maximizar la eficiencia en la tipificación de los aislamientos (Hoshino y Kapikian, 2000). Asimismo, la clasificación de los tipos P se ha complicado ya que es difícil disponer de sueros o AcMs que permitan su rápida identificación. Por lo tanto, las propiedades de VP4 se han estudiado principalmente por análisis de secuencias (Estes y Kapikian, 2007).

La designación numérica de los serotipos y genotipos G es idéntica y se utiliza un sólo número (ej. G1, G2, G4, G6, G10). En cambio, los genotipos P se han numerado de manera independiente de los serotipos P. Por lo tanto, los serotipos se nombran con un número abierto y los genotipos se identifican entre corchetes (ej. P1A y P[8], respectivamente) (Hoshino y Kapikian, 2000). A partir de diferentes investigaciones se ha demostrado que las cepas bovinas de RVA pueden presentar al menos 12 tipos G (G1–G3, G5, G6, G8, G10, G11, G15, G17, G21 y G24) y 11 tipos P (P[1], P[3], P[5–7], P[11], P[14], P[17], P[21], P[29] y P[33]). Sin embargo, la mayoría de las cepas bovinas se clasifican como G6, G8 y G10 en asociación con P[1], P[5] y P[11]. Esporádicamente, algunas cepas pueden identificarse como G1–G3, G5 y G11 o P[3], P[6], P[7] y P[14] (Matthijssens *et al.*, 2011). Las cepas de RV que infectan cerdos y bovinos presentan numerosos genotipos G y P, los cuales contribuyen a su diversidad a través del reordenamiento genético. Con frecuencia, estos animales desarrollan infecciones mixtas con cepas de RV que tienen diferentes especificidades para los genotipos G y P. Por ello existe un contexto favorable para que ocurra este reordenamiento genético (Papp *et al.*, 2013).

Durante un estudio realizado en cinco países de Europa (Dinamarca, Eslovenia, Francia, Hungría e Italia) se tipificaron los genotipos G y P en un total de 310 muestras de MF positivas a RVA, las cuales fueron obtenidas de terneros con y sin diarrea (0-52 semanas) (Dinamarca, $n = 28$; Eslovenia $n = 6$; Francia, $n = 40$; Hungría $n = 2$; Italia $n = 234$). Se identificaron diferentes genotipos G, los cuales incluyeron G4, G6, G8, G10, G11 y G12. El genotipo detectado con mayor frecuencia fue G6 (80%, 249/310) y en todos los países presentó una elevada prevalencia (68-100%). El genotipo G10 fue el segundo en importancia (13,2%, 41/310) y el rango de prevalencias entre países fue menor (0-28%). Los genotipos P mostraron una menor diversidad y se identificaron P[1], P[5] y P[11], aunque los dos últimos fueron más frecuentes. En Italia, la mayoría de las muestras fueron tipificadas como P[11] (69%) y en menor proporción P[5] (24%). En cambio, la mayoría de las muestras de Dinamarca y Francia fueron tipificadas como P[5] (64% y 60%, respectivamente). En todos los países evaluados, las combinaciones G6P[5] (33%, 103/310) y G6P[11] (44%, 136/310) fueron las más frecuentes,

tanto en infecciones simples como mixtas (diferentes genotipos G o P en la misma muestra) (Midgley *et al.*, 2012).

Una revisión bibliográfica recolectó la información generada por 75 trabajos científicos. En dichos estudios se analizaron 14076 muestras de bovinos y el 33,7% (4749/14076) resultaron positivas a RVA. A partir de una selección de 3204 muestras se realizó la tipificación molecular o serológica. Los tipos G identificados con mayor frecuencia incluyeron G6 (56,7%), G10 (20,6%) y G8 (3,5%). Las infecciones mixtas con diferentes tipos G representaron el 5,9% de las muestras, mientras que aquellas sin tipificar alcanzaron el 11,3%. Las especificidades más frecuentes para el tipo P comprendieron P[5] (25,9%), P[11] (21,5%) y P[1] (2,1%). Las infecciones mixtas con distintos tipos P alcanzaron el 6,2% de las muestras, mientras que aquellas sin tipificar totalizaron el 43,6%. Las combinaciones G y P identificadas con mayor frecuencia incluyeron G6P[5], G6P[11] y G10P[11], las cuales representaron el 40,4% de las muestras analizadas; la frecuencia de otras combinaciones fue menor al 2%. El tipo G6 predominó en los 5 continentes (América, África, Asia, Europa y Oceanía) con un rango de prevalencias del 39,8-78,3%. El tipo G10 fue el segundo en importancia y se detectó en Asia (36%), Europa (20,3%), América (14,2%) y Oceanía (8,7%). La frecuencia de G8 fue mucho menor (2-8%) en todos los continentes a excepción de África, en donde el 32% de las muestras resultaron positivas. Por otra parte, el tipo P[5] fue el más importante en Europa, América, Asia y Oceanía, con un rango de prevalencias del 37-50%. El tipo P[11] fue el segundo en orden de importancia y tuvo un rango de prevalencias del 15,4-34,8%. El tipo P[1] se identificó con mucha menor frecuencia (5-14%) y principalmente en Europa (Papp *et al.*, 2013).

En Argentina, un estudio previo evaluó los genotipos G y P de RVA utilizando la técnica de RT-PCR semi-anidada. Se analizaron muestras obtenidas de terneros de cría para carne y tambo con diarrea; sin embargo, el número de brotes de diarrea en rodeos para carne fue muy superior al de tambo (209 vs. 65, respectivamente). La combinación G6P[5] fue la más frecuente (60,4%) seguida por G10P[11] (4,4%), aunque también se detectaron G6P[11] (4,4%) y G10P[5] (2,4%). Los brotes mixtos se observaron en proporciones similares en cría (7%) y tambo (8%). La secuenciación de los productos de RT-PCR del gen codificante para VP7 y el análisis filogenético permitieron confirmar que las cepas G6P[5] constituyeron un grupo monofilético dentro del linaje IV de G6. En cambio, las cepas G6P[11] que no pudieron tipificarse con la técnica utilizada agruparon en el linaje III (Hun4-like) de G6. Además, en este trabajo se observó una clara diferencia en la distribución de los genotipos G y P en función al sistema productivo. En los campos de cría predominó G6 NCDV-like P[5] (75% de los casos), mientras que en

tambo se detectaron proporciones similares de los genotipos G6 Hun4-like P[11] (23%), G6 NCDV-like P[11] (11%) y G10P[11] (11%) (Garaicoechea *et al.*, 2006). Por otra parte, en nuestro país también se han encontrado, aunque esporádicamente, cepas de RVA con genotipos atípicos como por ejemplo G1 (cepa Bo/T449) (Blackhall *et al.*, 1992) y G15P[11] (cepa Arg/B383/98) (Matthijssens *et al.*, 2009).

A nivel mundial, sólo dos estudios demostraron una variación en la distribución de los tipos G y P de RVA en función del rodeo o sistema productivo. En Suecia, todas las cepas obtenidas en rodeos de carne pertenecieron al genotipo G6, mientras que las cepas de tambo fueron clasificadas, principalmente, como G10 (54%) y en menor proporción G6 (32%) (de Verdier Klingenberg *et al.*, 1999). Por otro lado, en EEUU (Dakota del Sur) se encontró una mayor prevalencia de G6 en los rodeos de carne con respecto a los de tambo (67% vs. 47,5%). En cambio, en los rodeos de tambo predominaron G10 (17,5% vs. 5,5%), G6+G10 (infecciones mixtas) (10%) y G? (muestras sin tipificar) (25%) (Lucchelli *et al.*, 1994).

En niños, las cepas con diferentes tipos G y P pueden co-circular dentro de una misma región y la prevalencia puede variar durante un mismo año en diferentes regiones de un mismo país. Asimismo, la prevalencia de los distintos serotipos puede mostrar cambios de un año a otro en la misma región (Hoshino y Kapikian, 2000). Estas características epidemiológicas del virus y su diversidad genética hacen que sea necesario continuar con los estudios de genotipificación de RVA bovino en distintos sistemas productivos y regiones. A su vez, es importante determinar si existen variaciones temporales en los genotipos que predominan en un mismo establecimiento. Finalmente, la relación genética entre las cepas de distintas regiones productivas no ha sido muy estudiada en nuestro país y los análisis de las secuencias deducidas de aa de VP7 y VP8* aportan información muy útil, ya que permiten conocer si las cepas circulantes difieren con respecto a las vacunales en los sitios antigénicos de dichas proteínas.

3.5 Diarrea por RVA en terneros

3.5.1 Patogenia

La patogenia de la infección y diarrea por RV es multifactorial (Varshney *et al.*, 1995) ya que depende de la edad del ternero (Bridger *et al.*, 1994; Varshney *et al.*, 1995), la virulencia de la cepa (Hall *et al.*, 1993; Bridger *et al.*, 1994) y la presencia de Ac calostrales en el lumen intestinal (Saif *et al.*, 1983; Parreño *et al.*, 2004). RV infecta a los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado (Hall *et al.*, 1993; Van Metre *et al.*, 2008) y la detección de Ag viral por IHQ indica que las infecciones tienen una localización preferencial por el tercio o

mitad superior de la vellosidad. En cambio, no se detecta Ag viral en las criptas glandulares del intestino delgado (Varshney *et al.*, 1995). También, es posible observar la presencia de Ag viral en el epitelio que recubre los folículos linfoides de las placas de Peyer (Hall *et al.*, 1993; Varshney *et al.*, 1995), en la lámina propia de las vellosidades (Hall *et al.*, 1993; Varshney *et al.*, 1995) y en los linfonódulos mesentéricos del intestino delgado proximal, medio y distal (Varshney *et al.*, 1995). Por otra parte, un estudio encontró Ag viral en los enterocitos de las criptas glandulares del ciego y colon; este hallazgo fue confirmado por ME (Varshney *et al.*, 1995).

El proceso patogénico comienza con la infección de los enterocitos maduros (Varshney *et al.*, 1995). La multiplicación viral dentro de estas células inicia cambios degenerativos o produce su lisis, causando el desprendimiento de un gran número de células. Esta alteración provoca un acortamiento (atrofia) y fusión de las vellosidades. El epitelio columnar alto es reemplazado por células inmaduras de tipo cuboide o plano. Estas últimas provienen de las criptas intestinales y su número aumenta (hiperplasia) (Scott *et al.*, 2004). Cuando la tasa de pérdida de enterocitos supera a la tasa de reemplazo, se produce un acortamiento de la vellosidad (Varshney *et al.*, 1995). Estos procesos patológicos comienzan en las porciones más craneales del yeyuno y progresan a lo largo del intestino delgado hasta alcanzar el íleon (Scott *et al.*, 2004).

Los cambios estructurales producidos en el intestino modifican sus funciones (Scott *et al.*, 2004) y la diarrea es una consecuencia, principalmente, de las alteraciones en la digestión y absorción de nutrientes (Van Metre *et al.*, 2008). Los enterocitos maduros poseen disacaridasas (Van Metre *et al.*, 2008) como la lactasa que digiere la lactosa en glucosa y galactosa (Scott *et al.*, 2004). La pérdida o destrucción de los enterocitos maduros determina que estos sean reemplazados por enterocitos inmaduros procedentes de las criptas (Scott *et al.*, 2004; Van Metre *et al.*, 2008). Si bien estas células son resistentes a la infección viral, tienen funciones secretoras y presentan una menor actividad de las enzimas disacaridasas (Scott *et al.*, 2004; Van Metre *et al.*, 2008) y sodio-potasio ATPasa (Van Metre *et al.*, 2008). Además, la reducción en el área de superficie de la mucosa intestinal disminuye la capacidad para absorber monosacáridos (glucosa y galactosa). Por lo tanto, la lactosa y otros nutrientes sin digerir aumentan la presión osmótica intraluminal (hipertonicidad) y esto favorece el desarrollo de diarrea y deshidratación (Scott *et al.*, 2004). A su vez, los ácidos grasos volátiles formados durante la fermentación a nivel del colon incrementan los efectos osmóticos (Scott *et al.*, 2004; Van Metre *et al.*, 2008). Si

bien existen otros mecanismos involucrados en el desarrollo de la diarrea por RVA, los mismos no han sido demostrados experimentalmente en terneros.

El inicio de la excreción viral suele coincidir con la aparición de la diarrea y en algunas circunstancias la duración de la excreción viral puede ser mayor a la duración de la diarrea (Bridger *et al.*, 1994). Esto último puede ocurrir cuando hay presencia de Ac pasivos de origen calostrado en el lumen intestinal (Saif *et al.*, 1983; Parreño *et al.*, 2004). La cantidad de virus eliminada en las heces suele ser elevada (Woode, 1978), pudiendo alcanzar hasta 10^{11} partículas virales/g de MF (MacLachlan y Dubovi, 2011).

En cuanto a la edad del ternero, dos estudios demostraron que la misma influye en la patogenia y en el desarrollo de la diarrea (Bridger *et al.*, 1994; Varshney *et al.*, 1995). Los terneros de 1 día de vida e infectados con una cepa de baja virulencia (C3-160) desarrollaron diarrea a las 24 horas post-inoculación (hpi) y la mayor excreción viral comenzó a las 24-29 hpi, coincidiendo con el inicio de la diarrea. En cambio, los terneros de 10 días de vida e infectados con la misma cepa no desarrollaron diarrea. La excreción viral en estos animales comenzó a las 48-72 hpi y el mayor título viral excretado se detectó a los 3-4 días post-infección (dpi). El área del epitelio intestinal con inmunomarcación para Ag viral fue 3 veces mayor en los terneros de 1 día de vida y la distribución de la infección fue uniforme en todo el intestino delgado. En cambio, en los terneros de 10 días de vida no se observó Ag viral en la primera porción de intestino delgado y la distribución de la infección fue en forma de parches. Con respecto a las lesiones, los terneros de 1 día de vida presentaron una reducción sustancial en la altura promedio de las vellosidades en las porciones media y distal del intestino delgado. En cambio, los terneros de 10 días de vida no mostraron modificaciones significativas en la altura promedio de las vellosidades. Generalizando, se observó que la infección del intestino y el daño de la mucosa fueron reducidos en los terneros de 10 días de vida en comparación con los terneros de 1 día de vida. Esta fue la razón por la cual los terneros de mayor edad no desarrollaron diarrea (Varshney *et al.*, 1995).

Con respecto a la virulencia, está demostrado que existen diferencias entre las cepas de RVA bovinas (Hall *et al.*, 1993; Bridger *et al.*, 1994). Las cepas de baja virulencia (C3-160 y 17/4) causaron diarrea en terneros gnotobióticos de 1 día de vida, la cual comenzó a las 24-48 hpi y tuvo una duración de 2-5 días. La excreción viral se mantuvo por 3-7 días y persistió por más de tiempo que la duración de la diarrea. Los terneros gnotobióticos de mayor edad (7-8 días y más de 70 días de vida) y desafiados con las mismas cepas no desarrollaron diarrea; sin embargo, comenzaron la excreción viral a los 2-4 dpi y la misma persistió por 3-7 días.

Utilizando el mismo modelo de infección pero con una cepa de mayor virulencia (39/58), los terneros de todas las edades (1 día, 8-10 días y más de 70 días de vida) desarrollaron diarrea y su duración fue de 5-9 días. La excreción viral comenzó a los 2-3 dpi y persistió por 4-6 días. Las diferencias en la virulencia no se vieron reflejadas ni en el título viral máximo alcanzado en las heces ni en la duración de la excreción viral (Bridger *et al.*, 1994). En términos generales, las cepas que sólo causan diarrea en los terneros recién nacidos e infectan de forma subclínica a los terneros de mayor edad deberían considerarse de baja virulencia. En cambio, aquellas cepas que causan enfermedad en los terneros de todas las edades deberían considerarse virulentas (Bridger *et al.*, 1994).

3.5.2 Presentación clínica

Los terneros infectados con RVA manifiestan anorexia, diarrea, decaimiento, deshidratación (Cilli y Castrucci, 1981) y pérdida de peso (Woode, 1978); la presencia de fiebre es variable (Cilli y Castrucci, 1981). El período de incubación suele ser corto (24-72 h) (Bridger *et al.*, 1994) y la diarrea tiene una duración de 2-10 días (Cilli y Castrucci, 1981; Bridger *et al.*, 1994). El cuadro clínico de un ternero infectado con RVA es muy variable. En algunos casos puede ser severo, hasta incluso causarle la muerte (McNulty *et al.*, 1976; Woode *et al.*, 1978; Pastoret *et al.*, 1984), mientras que en otros casos ocurren infecciones subclínicas (McNulty *et al.*, 1976; Woode *et al.*, 1978; Pastoret *et al.*, 1984).

Si bien la severidad del cuadro clínico puede variar en función de la virulencia de las cepas, con mayor frecuencia suele estar relacionada con la dosis viral, inmunidad y edad del ternero, condiciones ambientales e infecciones concurrentes (Janke, 1989). La diarrea por RVA se puede presentar en terneros de 1-8 semanas de vida (Murphy *et al.*, 1999), pero la mayoría de los casos clínicos ocurren en las primeras 2-3 semanas (McNulty *et al.*, 1976), alcanzando un pico de incidencia entre los 10-14 días de vida (Murphy *et al.*, 1999). El virus también puede detectarse en terneros de tan sólo 2 días de vida, aunque ello suele estar asociado a fallas en el calostro (McNulty *et al.*, 1976). La infección clínica en terneros mayores a 1 mes de vida es rara (Janke, 1989).

3.5.3 Lesiones macroscópicas e histológicas

Las lesiones macroscópicas asociadas a la infección por RVA semejan los hallazgos inespecíficos de la diarrea indiferenciada del ternero. El intestino delgado se observa flácido, con la pared delgada, dilatado y presenta contenido fluido en toda la longitud del intestino; la mucosa suele estar levemente congestiva. El contenido intestinal usualmente es acuoso, amarillo-verdoso y se separa en dos fases, una de las cuales es más sólida y consiste de leche coagulada o mucus.

A veces el contenido es más homogéneo y tiene consistencia cremosa. El intestino grueso presenta contenido fluido, cremoso o pastoso, usualmente amarillo o blanco (Brown *et al.*, 2007).

Las lesiones microscópicas incluyen atrofia leve o moderada de las vellosidades (con forma de “garrote” o clava), acompañada por fusión y engrosamiento de las mismas (Hall *et al.*, 1993; Varshney *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007). Usualmente hay un infiltrado moderado de células mononucleares en la lámina propia (Brown *et al.*, 2007) y se pueden observar macrófagos en los quilíferos centrales (Hall *et al.*, 1993). Las vellosidades se recubren de enterocitos cuboides o planos (Hall *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2007). Las lesiones del epitelio intestinal son focales y suelen estar presentes en las puntas de las vellosidades o a los costados de las mismas. A veces también se observan grupos de enterocitos degenerados, los cuales semejan un “pellizcamiento” de la punta de la vellosidad y esta última puede perder su epitelio (vellosidades desnudas) (Hall *et al.*, 1993). La profundidad de las criptas intestinales aumenta (hipertrofia) (Hall *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2007) en el intestino delgado proximal, medio y distal (Hall *et al.*, 1993). La distribución de las lesiones puede variar entre animales y con el transcurso del tiempo luego de la infección, ya que el inicio del mayor daño no ocurre en forma sincrónica a lo largo de todo el intestino. A diferencia de lo que sucede con CoV, las infecciones por RV no causan lesiones a nivel del colon (Brown *et al.*, 2007).

En nuestro país, hasta el momento, se han realizado infecciones experimentales de terneros utilizando la cepa Indiana (G6P[5]) con la finalidad de evaluar diferentes estrategias de inmunización pasiva basadas en la suplementación de la leche con calostro bovino hiperinmune (Parreño *et al.*, 2010) y con IgY de yema de huevo obtenida de gallinas inmunizadas con RVA (Vega *et al.*, 2011). Sin embargo, estos estudios no describieron las lesiones asociadas a la infección con la cepa Indiana (G6P[5]) y en nuestro país tampoco hay información disponible de infecciones experimentales con cepas de RVA correspondientes a los genotipos G6(III)P[11] (o Hun4-like) y G10P[11]. Además, si bien en otros países se han realizado estudios de patogenicidad para evaluar diferentes cepas, la mayoría de estas últimas no han sido caracterizadas molecularmente.

4. Coronavirus

4.1 Generalidades y estructura del virión

Coronavirus (CoV) bovino (CoVb) se clasifica en el orden Nidovirales, familia *Coronaviridae*, género Betacoronavirus y especie Betacoronavirus 1 (ICTV, 2011). Este virus es menos estable que RV y es sensible a las condiciones del medio ambiente (Kapil *et al.*, 1990), aunque en presencia de materia orgánica puede mantenerse viable por 3 días (Boileau y Kapil, 2010). En general, se considera que la prevalencia de la enfermedad es más elevada durante el invierno y ello se debería a la mayor estabilidad del virus con el frío (Saif, 2008; MacLachlan y Dubovi, 2011).

En el año 1973 se describe por primera vez el rol de CoV como causa de diarrea en terneros en los EEUU (Mebus *et al.*, 1973; MacLachlan y Dubovi, 2011) y desde entonces se demostró que es ubicuo en la población bovina de todo el mundo (Saif, 2008). CoVB es un patógeno entérico primario (Boileau y Kapil, 2010), aunque algunos autores lo consideran como un virus pneumoentérico (Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010), ya que tiene tropismo por el tracto digestivo y respiratorio (McNulty *et al.*, 1984; Reynolds *et al.*, 1985; Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010). La prevalencia e incidencia de CoVB en terneros con diarrea varía del 8-70% (Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010), aunque las infecciones subclínicas ocurren en el 0-24% de los terneros (Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010). Los casos de diarrea por CoVB suelen presentarse en terneros de 3-30 días de vida (Heckert *et al.*, 1990; Boileau y Kapil, 2010), momento en el cual declinan los Ac calostrales (MacLachlan y Dubovi, 2011). Sin embargo, esta enfermedad puede observarse en terneros recién nacidos (24 h posparto) y privados de calostro o en terneros de 3-6 meses de vida (Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010; MacLachlan y Dubovi, 2011).

Los brotes de enfermedad con frecuencia ocurren anualmente en un mismo establecimiento (Saif, 2008) y los terneros infectados de forma clínica o subclínica representan reservorios para el virus dentro del rodeo (Kapil *et al.*, 1990; Saif, 2008). Además, los bovinos de mayor edad pueden excretar el virus por sus fosas nasales de manera esporádica y constituyen reservorios adicionales, al igual que los bovinos adultos con infecciones clínicas o subclínicas (Saif, 2008). Desafortunadamente, en Argentina no se dispone información acerca de la importancia relativa de los bovinos adultos como reservorios del virus.

Los CoV son grandes, envueltos y tienen un genoma de ARNsc, lineal y de sentido positivo (Lai *et al.*, 2007; Boileau y Kapil 2010; MacLachlan y Dubovi, 2011), siendo el genoma

más grande (27.6–31 kb) de todos los virus de ARN no segmentados (Lai *et al.*, 2007; MacLachlan y Dubovi, 2011). El ARN genómico es infeccioso y presenta una capucha en el extremo 5' y poli-A en el extremo 3' (MacLachlan y Dubovi, 2011). Las principales proteínas del virión incluyen la fosfoproteína de la nucleocápside (N, 50-60 kDa) y varias proteínas que forman la envoltura y las espículas, entre ellas: 1) la glicoproteína de las espículas principales (S) (180-220 kDa); 2) la glicoproteína de membrana (M) (23-35 kDa); 3) la proteína de la envoltura (E) (9-12 kDa), la cual junto a la proteína M son esenciales para el ensamblado del virión; 4) la glicoproteína hemoaglutinina esterasa (HE) (65 kDa) representa una proteína de membrana y sus dímeros forman las espículas pequeñas (Fig. 7.1) (Lai *et al.*, 2007; MacLachlan y Dubovi, 2011).

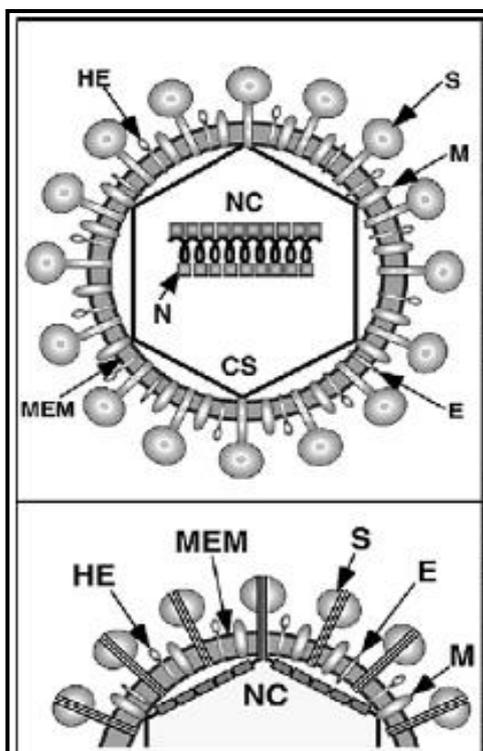


Fig. 7.1. Estructura de los viriones de coronavirus. MEM, membrana lipídica; S, proteína de la espícula; M, proteína principal de membrana; E, proteína menor de la envoltura; HE, esterasa de la hemoaglutinina; N, proteína de la nucleocápside; CS, cubierta del core; NC, nucleocápside. Fuente: *Fenner's Veterinary Virology* (MacLachlan y Dubovi, 2011).

4.2 Técnicas de diagnóstico

Las muestras a recolectar para el diagnóstico de CoVB en un ternero vivo incluyen MF (2-5 g) e hisopado nasal (HN) embebido en PBS (pH 7,2) dentro de un tubo con tapa hermética (Boileau y Kapil, 2010). En el animal necropsiado se recomienda recolectar muestras del colon espiral (Kapil *et al.*, 1990; Boileau y Kapil, 2010), tercio superior de la tráquea y pulmón (Boileau y Kapil, 2010). En este último órgano resulta crítico obtener varios especímenes, ya que la distribución de CoVB es focal. También se pueden recolectar trozos de cornetes nasales, ya que son fuertemente positivos a la presencia de Ag viral (Boileau y Kapil, 2010). Las técnicas de diagnóstico utilizadas para detectar CoV incluyen ELISA (Smith *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*,

2006), RT-PCR y PCR semi-anidado (Cho *et al.*, 2001; Barry *et al.*, 2009) e IFD a partir de HN o improntas de pulmón (Saif *et al.*, 1986; Kapil *et al.*, 1991). En otros países se emplean las técnicas de IFD (de cortes congelados) e IHQ para detectar Ag viral en diferentes tejidos.

4.3 Estudios epidemiológicos de CoVB en Argentina

En dos trabajos se evaluó la circulación del virus durante 10 años (1994-2005) (Rodríguez *et al.*, 2006) y 17 años (1994-2010) (Bok *et al.*, 2015). En este último estudio se incluyeron los resultados previos (Rodríguez *et al.*, 2006). En total se evaluaron 1058 brotes de DNT ocurridos en rodeos de cría ($n = 324$), tambos ($n = 239$) y establecimientos sin especificar la actividad productiva ($n = 495$). Se analizaron 5365 especímenes fecales de terneros y el diagnóstico de CoVB se realizó por ELISA indirecto de captura monoclonal. CoVB circuló en el 5,95% (63/1058) de los brotes de DNT y el 1,7% (92/5365) de las muestras resultaron positivas. La circulación viral en los brotes que afectaron a rodeos de cría fue del 4,32% (14/324), en los tambos fue del 12,13% (29/239) y en los establecimientos sin especificar la actividad productiva fue del 4,04 (20/495). La circulación de CoVB fue significativamente mayor en tambo con respecto a cría (Bok *et al.*, 2015). La investigación mencionada y este trabajo de tesis contribuyeron para generar información epidemiológica actualizada de la circulación de CoVB en nuestro país.

4.4 Diarrea por CoVB en terneros

4.4.1 Patogenia

La enfermedad causada por CoVB presenta algunas diferencias con respecto a la producida por RVA. CoVB tiene la capacidad de replicar y producir daño grave no sólo en la mucosa del intestino delgado sino también en la del colon (Torres de Medina *et al.*, 1995). En terneros gnotobióticos (libres de gérmenes) está demostrado que la diarrea por CoVB es más grave que la ocasionada por RVA (Torres de Medina *et al.*, 1995) e incluso puede causar la muerte del ternero (Torres de Medina *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2007).

Otra particularidad de CoVB es su capacidad para infectar el tracto respiratorio de los bovinos (Reynolds *et al.*, 1985; Saif *et al.*, 1986; Kapil *et al.*, 1991; Saif, 2008). Por ello, durante muchos años, los investigadores han debatido acerca de si los aislamientos del tracto digestivo (BECoV, *bovine enteric coronavirus*) y respiratorio (BRCoV, *bovine respiratory coronavirus*) corresponden al mismo virus o sin en realidad son diferentes en sus propiedades biológicas, antigénicas o genéticas. Muchas publicaciones sustentan la hipótesis que BRCoV y BECoV pueden ser el mismo virus en diferentes etapas del ciclo de infección. Además, hay trabajos que

sugieren similitudes antigénicas y genéticas entre los aislamientos del tracto respiratorio y digestivo, mientras que otros estudios indican lo contrario (Boileau y Kapil, 2010). Sin embargo, hasta el presente existe una sola especie de CoVB (MacLachlan y Dubovi, 2011).

En cuanto a la patogenia, la principal vía de transmisión es fecal-oral y en menor medida por vía respiratoria (aerosoles) (Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010). Experimentalmente, se ha logrado reproducir la diarrea en terneros gnotobióticos y convencionales (privados de calostro) luego de la inoculación por vía intranasal (IN), oral (OR) u oral-intranasal (OR-IN) con la cepa entérica DB2 (Saif *et al.*, 1986). CoVB infecta los enterocitos del intestino delgado distal y del intestino grueso (Reynolds *et al.*, 1985; Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010), aunque también infecta el epitelio de las vías respiratorias superiores (Brown *et al.*, 2007; Boileau y Kapil, 2010; MacLachlan y Dubovi, 2011), incluyendo la cavidad nasal y tráquea (Reynolds *et al.*, 1985; Saif *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 2007; Boileau y Kapil, 2010). Ocasionalmente, el virus puede infectar las células del pulmón (Boileau y Kapil, 2010; MacLachlan y Dubovi, 2011), ya que se ha demostrado la presencia de Ag viral por IFD e IHQ (McNulty *et al.*, 1984; Saif *et al.*, 1986; Kapil *et al.*, 1991; Park *et al.*, 2007).

Al inicio de la infección, el virus multiplica en los enterocitos que recubren las vellosidades del intestino delgado proximal y luego progresa hacia caudal (Torres de Medina *et al.*, 1995). Las células de las criptas glandulares del intestino delgado son eximidas de la infección (Torres de Medina *et al.*, 1995), aunque ocasionalmente pueden contener Ag viral (Reynolds *et al.*, 1985; Torres de Medina *et al.*, 1995). La infección es citocida y en un corto período los enterocitos infectados se desprenden hacia el lumen intestinal (Torres de Medina *et al.*, 1995) y son reemplazadas por células cuboides (Torres de Medina *et al.*, 1995). Este proceso causa atrofia de las vellosidades y produce diarrea (Kapil *et al.*, 1991; Torres de Medina *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2007) como consecuencia de una malaabsorción (MacLachlan y Dubovi, 2011). La pérdida de enterocitos en las vellosidades es extensa a las 40-90 h de iniciada la diarrea (Torres de Medina *et al.*, 1995). A nivel del colon, el virus infecta y destruye los enterocitos superficiales y de las criptas (Torres de Medina *et al.*, 1995; Saif, 2008), produciendo atrofia de los pliegues (Torres de Medina *et al.*, 1995). Luego del desafío con la cepa neumointestinal (Minnesota) se detectó el virus por IFD en biopsias de yeyuno, íleon y colon espiral recolectadas a los 2, 7, 14 y 21 dpi. En la etapa aguda el virus infectó los enterocitos superficiales del intestino, aunque pudo persistir en las criptas por 21 días (Kapil *et al.*, 1990).

Los terneros inoculados por diferentes vías (OR-IN, OR e IN) con la cepa entérica DB2 desarrollaron diarrea con un período de incubación de 1-4 días (Saif *et al.*, 1986). Asimismo, la

infección experimental de terneros descalostrados por vía OR con la cepa neumointestinal causó diarrea con un período de incubación de 1, 4 y 5 días (Kapil *et al.*, 1991). Luego del desafío por vía OR-IN con la cepa DB2, se evaluó la excreción viral por MIE y cultivo celular e inmunofluorescencia (CCIF). El virus se excretó simultáneamente por MF e HN. En la mayoría de los terneros el comienzo de la excreción precedió al inicio de la diarrea y alcanzó un pico a los 2-4 dpi. En los terneros inoculados por vía OR se observó un pico de excreción a los 2-4 dpi en la MF y a los 3-6 dpi en los HN. Sin embargo, más de la mitad de los terneros no excretó el virus por sus fosas nasales. Los terneros desafiados por vía IN excretaron el virus por MF e HN, alcanzándose un pico a los 2-4 dpi. No obstante, la excreción en los HN precedió a la excreción por MF en la mayoría de los terneros (Saif *et al.*, 1986). En los terneros desafiados con la cepa neumointestinal (Minnesota) se detectó Ag viral por IFD en las células nasales a partir del 3 dpi, aunque la cantidad de células infectadas aumentó a los 7 dpi (Kapil *et al.*, 1991).

La duración de la excreción viral es variable. Utilizando la técnica de hemoaglutinación se detectó la cepa neumointestinal (Minnesota) en MF durante 8-11 días. Sin embargo, el pico de excreción viral ocurrió a los 4-6 dpi y fue de corta duración (2-3 días) (Kapil *et al.*, 1990). Mediante las técnicas de CCIF y MIE se detectó la cepa DB2 en MF por al menos 7 días (desafío OR-IN) y 14 días (desafío OR). La excreción del virus a partir de fosas nasales se mantuvo por 6 días (desafío OR-IN) y 14 días (desafío IN) (Saif *et al.*, 1986). Asimismo, la excreción simultánea de CoVB por el tracto digestivo (heces) y respiratorio (secreción nasal) está demostrada (Reynolds *et al.*, 1985; Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010; MacLachlan y Dubovi, 2011), tanto en condiciones experimentales (Saif *et al.*, 1986; Kapil *et al.*, 1990; Kapil *et al.*, 1991) como naturales (Reynolds *et al.*, 1985). La excreción viral simultánea parecería ser frecuente y se la asocia significativamente con la presencia de diarrea (Reynolds *et al.*, 1985).

En cuanto a las infecciones del tracto respiratorio, luego de la inoculación por vía OR-IN e IN con la cepa entérica DB2 se pudo detectar Ag por IFD en especímenes de cornetes nasales, tráquea e improntas de pulmón. En cambio, luego de la inoculación por vía OR fue menos frecuente encontrar células fluorescentes en el tracto respiratorio. Los terneros inoculados con la cepa DB2 desarrollaron lesiones a nivel intestinal, pero la presencia de Ag viral en los pulmones fue menos frecuente (20-30% de los terneros) (Saif *et al.*, 1986). Por otra parte, en un estudio diferente, los terneros inoculados por vía OR con la cepa neumointestinal (Minnesota) desarrollaron signos respiratorios e incluso murieron como consecuencia de neumonía. Los signos clínicos se presentaron a los 5, 9 y 21 dpi. El tejido pulmonar de algunos terneros

demonstró la presencia de Ag viral (IFD) y lesiones histológicas a los 7 y 10 dpi (Kapil *et al.*, 1991).

Un argumento factible se ha propuesto para explicar la patogenia de CoVB. El mismo está basado en el curso temporal de la excreción nasal y fecal durante las infecciones naturales y experimentales. Luego de una importante replicación inicial en la mucosa nasal, CoVB se puede diseminar hacia el tracto digestivo por medio de la deglución de una gran cantidad de virus presente en las secreciones mucosas. Por lo tanto, la amplificación inicial del virus en el tracto respiratorio y la cubierta protectora de mucus permitirían que una mayor cantidad de virus alcance el intestino luego de la deglución (Saif, 2008).

4.4.2 Presentación clínica

Es probable que las manifestaciones clínicas de la enfermedad no sólo estén relacionadas al virus sino también a factores del huésped, ambiente y co-infecciones con otros patógenos (Boileau y Kapil, 2010). La severidad de la enteritis por BCoV depende de la edad y estado inmunológico del ternero al momento de la infección, de la dosis infectiva y la virulencia de la cepa (Saif, 2008). En los terneros de menor edad se incrementa la severidad de la infección y se acorta el período de incubación en comparación con los terneros de mayor edad. Esto se observa, especialmente, en aquellos terneros que sufren una FTP de inmunidad (Boileau y Kapil, 2010).

En general, los terneros enfermos tienen 7-10 días de vida, pero los terneros mayores a 3 semanas pueden verse afectados (Torres de Medina *et al.*, 1995). El período de incubación es de 3-4 días y luego los terneros desarrollan una diarrea severa que persiste por 2-8 días (Torres de Medina *et al.*, 1995; Saif, 2008). La MF puede presentar moco y estar teñida con sangre (Kapil *et al.*, 1990; Kapil *et al.*, 1991; Torres de Medina *et al.*, 1995). La diarrea produce deshidratación, decaimiento, debilidad y pérdida del reflejo de succión (Torres de Medina *et al.*, 1995; Boileau y Kapil, 2010), aunque la mayoría de los terneros se recupera. Sin embargo, algunos pueden desarrollar fiebre, postración y colapso cardiorespiratorio seguido de muerte cuando la diarrea es severa y no reciben tratamiento (Boileau y Kapil, 2010); la muerte asociada a las infecciones por CoVB se ha observado experimentalmente (Kapil *et al.*, 1991; Park *et al.*, 2007; Saif, 2008). CoVB también está implicado como causa de enfermedad respiratoria leve (rinitis y tos) o neumonía en terneros de 2-6 meses de vida (Heckert *et al.*, 1989; Saif, 2008).

4.4.3 Lesiones macroscópicas e histológicas

En la necropsia sólo se observan las lesiones no específicas de la DNT. Raramente, se aprecia una tiflocolitis fibrinonecrótica y los linfonódulos mesentéricos pueden estar agrandados y húmedos (Brown *et al.*, 2007). También se pueden observar petequias en la superficie luminal

del íleon y colon (Saif *et al.*, 1986). A nivel del aparato respiratorio, un estudio describió la presencia de lesiones compatibles con neumonía (áreas antero-ventrales de coloración roja y consistencia firme). Sin embargo, la mayoría de las infecciones experimentales no pudieron demostrar la presencia de lesiones macroscópicas en pulmón (Kapil *et al.*, 1991).

Con respecto a las lesiones microscópicas, las mismas varían en función de la severidad y duración de la infección (Brown *et al.*, 2007). En el intestino delgado se observa un acortamiento (atrofia) moderado de las vellosidades (Saif *et al.*, 1986; Kapil *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2007), las cuales presentan sus extremos romos o en punta; la fusión de vellosidades puede ser frecuente (Brown *et al.*, 2007). La atrofia de las vellosidades en el yeyuno e íleon se observa a los 3-7 dpi (Saif *et al.*, 1986). Las células cuboides o planas recubren las vellosidades y la exfoliación del epitelio puede ser evidente. Las criptas muestran hiperplasia y la lámina propia puede contener un infiltrado moderado con predominio de células mononucleares, algunas de las cuales tienen núcleos con picnosis o cariorrexis (Brown *et al.*, 2007). Al inicio de la infección se produce necrosis y depleción linfoidea en los linfonódulos mesentéricos (Kapil *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2007). Las placas de Peyer de los animales enfermos por 4-5 días muestran involución y predominio de histiocitos (Kapil *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2007).

El colon suele tener una gran cantidad de células infectadas que se tiñen por IFD. Al inicio de la infección se observa exfoliación, aplanamiento y áreas con erosión en forma de parches (Kapil *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2007). Los pliegues del colon sufren atrofia a causa de la destrucción de las células epiteliales de revestimiento de los pliegues y las criptas (Torres de Medina *et al.*, 1995). Algunas glándulas del colon están cubiertas por epitelio aplanado y contienen células exfoliadas y restos necróticos (Kapil *et al.*, 1991; Torres de Medina *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2007). En la lámina propia se puede apreciar una reacción inflamatoria mixta y los neutrófilos pueden estar presentes dentro de las glándulas dañadas. Cuando la infección está más avanzada, las glándulas colónicas se observan dilatadas y llenas de restos celulares, pero otras glándulas pueden tener hiperplasia del epitelio (Brown *et al.*, 2007).

En el pulmón de los terneros inoculados experimentalmente se observa neumonía intersticial, congestión, hemorragias y enfisema, aunque estas lesiones no siempre están presentes en el mismo momento (Kapil *et al.*, 1991). Un estudio más reciente realizó una descripción completa de los hallazgos histopatológicos en terneros desafiados con la cepa KWD3, la cual fue obtenida de un caso de disentería de invierno. A los 3 dpi se observó necrosis y desprendimiento de neumocitos, dejando la lámina basal expuesta. Esto fue acompañado por una hiperplasia de neumocitos de tipo II e infiltrado leve del intersticio con macrófagos. En la

luz alveolar se observaron células descamadas y macrófagos, además de coágulos de fibrina y material proteico eosinofílico. A los 5 y 8 dpi se observaron las mismas lesiones pero el infiltrado intersticial fue más marcado, con macrófagos y algunos linfocitos. Además, se observó descamación y necrosis del epitelio de los alvéolos, bronquiolos y bronquios (Park *et al.*, 2007).

5. *Escherichia coli*

5.1 Taxonomía

Escherichia coli pertenece al orden *Enterobacteriales*, familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichieae*, género *Escherichia*, especie *coli* (Holt *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 2002). Este género comprende cinco especies, de las cuales *E. coli* es la de mayor importancia clínica en animales (Birbestein y Zee, 1990; Hirsh, 1999). El pediatra alemán Theobald Escherich descubrió la bacteria en el año 1885 y la denominó *Bacterium coli* (Blanco *et al.*, 2002; Welch, 2006). Posteriormente, recibió el nombre de *Escherichia coli* en referencia a su descubridor (Welch, 2006) y a su hábitat principal (el colon) (Gyles, 1993).

5.2 Morfología y características generales

E. coli es un bacilo recto (1-1,5 x 2-6 μm) y gramnegativo que se presenta aislado o de a pares (Fig. 8.1) (Blanco y Blanco, 1993; Holt *et al.*, 1994) y no forma esporos (Blanco *et al.*, 2002; Parma, 2007). En cuanto a su metabolismo tiene necesidades nutricionales sencillas y es una bacteria anaerobia facultativa (Blanco *et al.*, 2002). En general posee flagelos peritricos que le dan movilidad (Hirsh, 1999), aunque algunas cepas son inmóviles (Nicolet, 1985; Parma, 2007). *E. coli* crece rápidamente en agar MacConkey y forma colonias rosadas de aspecto brillante (Fig. 8.1) (Gyles y Fairbrother, 2010) debido a que fermenta la lactosa (L+) y produce la acumulación de compuestos ácidos. Estos últimos disminuyen el pH del medio de cultivo y provocan un cambio de color en el indicador (rojo neutro) (Quinn *et al.*, 1994). Las propiedades bioquímicas que permiten su rápida identificación incluyen los resultados positivos a las pruebas de indol, rojo de metilo y oxidación-fermentación, mientras que las pruebas de oxidasa, Voges-Proskauer, citrato, ureasa y sulfuro de hidrógeno resultan negativas (Quinn *et al.*, 1994; Gyles y Fairbrother, 2010).

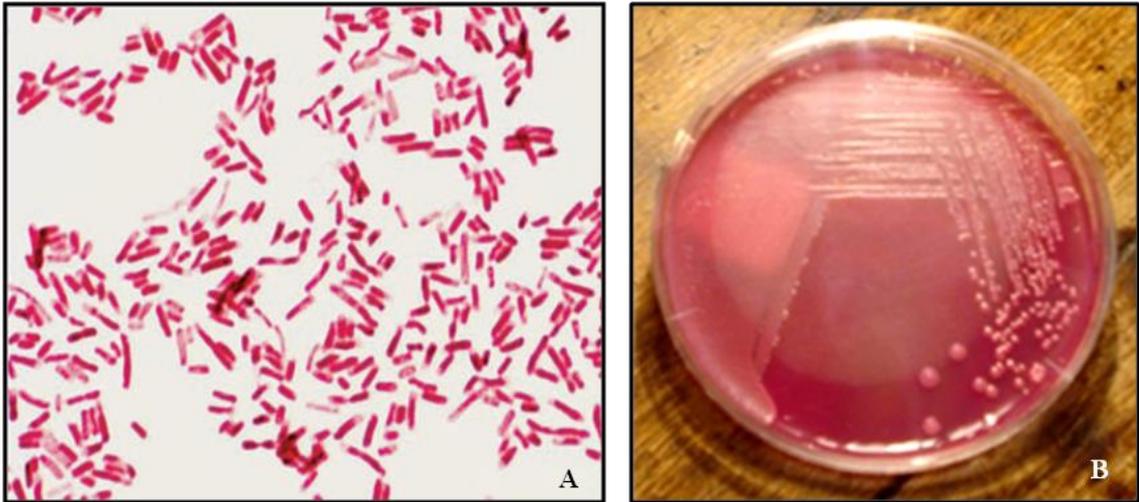


Fig. 8.1. *Escherichia coli*. Bacilos coloreados de rojo mediante la tinción de Gram (A). Fuente: Manning, 2005. Colonias lactosa positivas y de color rosado característico en una placa de agar MacConkey (B).

5.3 Hábitat natural y persistencia en el ambiente

E. coli es la principal bacteria anaerobia facultativa de la microbiota intestinal de todos los mamíferos (Kaper *et al.*, 2004) y alcanza su mayor concentración en el intestino grueso y la MF (10^7 - 10^9 bacterias/g) (Gyles y Fairbrother, 2010). Los animales recién nacidos tienen un intestino estéril, pero rápidamente se contamina con bacterias que provienen de la madre y del medio ambiente. *E. coli* se mantiene allí formando parte de la microbiota normal del intestino durante toda la vida del animal (Gyles y Fairbrother, 2010). Las cepas comensales raramente causan enfermedad, excepto en los hospedadores inmunodeficientes o cuando se altera la integridad del tracto digestivo. La mucosa del colon es el principal nicho de las cepas comensales y allí logran competir de manera exitosa (Kaper *et al.*, 2004). Esta bacteria se excreta en las heces y sobrevive por semanas o meses en las partículas fecales, polvo y agua (Quinn *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 2002).

5.4 Importancia para la salud pública

Según un informe, se estima que *E. coli* produce 630 millones de casos de diarrea y 775.000 muertes al año en todo el mundo, afectando fundamentalmente a la población infantil de los países subdesarrollados (Blanco y Blanco, 1993). Por otra parte, las infecciones asociadas a *E. coli* verotoxigénica pueden causar casos esporádicos o brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) que ponen en riesgo la vida de los pacientes (Paton y Paton, 1998a; Agbodaze, 1999). Actualmente, el SUH es considerado como una enfermedad endémica para Argentina, ya que se producen 400 casos nuevos por año y es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños (Rivas *et al.*, 2006).

5.5 Serogrupos y serotipos

En el año 1947, Kauffmann propone una forma de diferenciar a las cepas de *E. coli* basándose en la determinación de los Ags superficiales O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares) (Blanco y Blanco, 1993; Blanco *et al.*, 2002). De esta manera, el serogrupo de una cepa de *E. coli* queda establecido por el Ag O, mientras que el serotipo se determina según las combinaciones de los Ags O y H (Ørskov y Ørskov, 1992; Nataro y Kaper, 1998). Para la designación de un serotipo se utiliza una nomenclatura que incluye los Ags O:K:H y sus respectivos números (ej. O157:K85:H19) (Quinn *et al.*, 1994; Parma, 2007). La clasificación basada en serotipos ha sido de mucha utilidad durante los estudios epidemiológicos, ya que permitió establecer una relación entre los serotipos de las cepas y las enfermedades causadas por ellas (Blanco y Blanco, 1993; Blanco *et al.*, 2002).

5.6 Patotipos de *E. coli*

La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales y residen en el intestino, pero no representan un perjuicio para la salud del hospedador (Holland, 1990; Gyles y Fairbrother, 2010). Sin embargo, una pequeña proporción de las cepas son patógenas debido a que expresan factores de virulencia (Gyles y Fairbrother, 2010), los cuales aumentan su capacidad para adaptarse a nuevos nichos (Kaper *et al.*, 2004) y están involucrados en los mecanismos que producen enfermedades (Holland, 1990; Kaper *et al.*, 2004; Mokady *et al.*, 2005b). Los factores de virulencia son codificados por elementos genéticos móviles, que permiten crear nuevas combinaciones, o por elementos genéticos que evolucionan para quedar fijos dentro del genoma bacteriano (Kaper *et al.*, 2004). El mecanismo más factible para la evolución de los grupos patogénicos de *E. coli* es la recombinación genética, especialmente a través de la transferencia horizontal de genes (Nagy y Fekete, 2005).

Las cepas de *E. coli* se pueden clasificar, según criterios genéticos y por el tipo de infección que producen, en tres grandes grupos: comensales, patógenas intestinales y patógenas extraintestinales (Russo y Johnson, 2000; Köhler y Dobrindt, 2011; Mainil, 2013). Las cepas comensales carecen de los atributos de virulencia presentes en las cepas patógenas (Russo y Johnson, 2000). En cambio, los dos últimos grupos incluyen cepas de *E. coli* que son capaces de causar un amplio espectro de enfermedades intestinales (diarrea y colitis hemorrágica) o extraintestinales (septicemia, meningitis e infecciones tracto urinario-ITU) en animales (Holland, 1990; Mokadi *et al.*, 2005b, Gyles y Fairbrother, 2010). La severidad de estas enfermedades es muy variable y pueden presentarse desde infecciones autolimitantes hasta enfermedades altamente riesgosas para la vida (Mainil, 2013).

Las cepas de *E. coli* también se pueden clasificar en grupos patogénicos o patotipos según sus factores de virulencia y los mecanismos que utilizan para causar enfermedades (Gyles y Fairbrother, 2010). Los patotipos de *E. coli* han quedado constituidos por aquellas combinaciones de factores de virulencia que fueron más exitosas y lograron persistir (Kaper *et al.*, 2004). Si bien existe cierta superposición entre los atributos de virulencia de los patotipos causantes de diarrea, cada uno de ellos presenta una combinación característica que resulta en un mecanismo patogénico distintivo (Russo y Johnson, 2000). La identificación de estos factores de virulencia ha contribuido a definir los mecanismos por los cuales *E. coli* causa diarrea (Holland, 1990).

Los patotipos de mayor importancia en animales incluyen a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* verotoxigénica (VTEC), *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC o SePEC) y *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) (Gyles y Fairbrother, 2010; Mainil, 2013). Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) representan un subgrupo de VTEC (Levine *et al.*, 1987; Blanco y Blanco, 1993), mientras que algunos autores incluyen a las cepas NTEC dentro del patotipo SePEC (Mainil, 2013). Generalizando, los patotipos ETEC, EPEC, VTEC y EHEC son considerados patógenos intestinales y ExPEC es responsable de las infecciones extraintestinales (septicemia, mastitis, meningitis e ITU) (Kaper *et al.*, 2004; Gyles y Fairbrother, 2010).

5.6.1 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

a) Definición

Este patotipo incluye a todas las cepas de *E. coli* capaces de elaborar toxinas termolábiles (LT) o termoestables (ST) (Nataro y Kaper, 1998). ETEC se caracteriza por producir una diarrea acuosa y severa que afecta a terneros neonatos y cerdos de pocos días de vida o recién destetados (Blanco *et al.*, 2002; Nagy y Fekete, 2005; Gyles y Fairbrother, 2010).

b) Factores de virulencia y genes codificantes

La producción de enterotoxinas y la capacidad para expresar fimbrias de colonización constituyen los principales atributos de virulencia de ETEC (Nagy y Fekete, 2005; Gyles y Fairbrother, 2010). Las cepas bovinas se caracterizan por producir la enterotoxina STa y presentan las fimbrias de adhesión F5 (K99) y F41 (Gyles y Fairbrother, 2010), aunque algunas cepas también poseen F17 (Blanco *et al.*, 2002). Los serogrupos característicos de las ETEC bovinas incluyen O8, O9, O20 y O101 (Nagy y Fekete, 1999; Blanco *et al.*, 2002).

i) Enterotoxinas

La toxina LT está codificada por el gen *elt* (también denominado *etx*) (Nataro y Kaper, 1998) y consiste de una subunidad A (A1 y A2) (240 aa, 28-30 kDa) y cinco subunidades B (103 aa, 11,5 kDa). Las subunidades B se unen a los receptores de la superficie celular que fueron identificados como gangliósidos (GM1 y GD1b) o glicoproteínas (Nataro y Kaper, 1998; Nagy y Fekete, 2005). El fragmento A1 activa el sistema de la adenilato ciclasa y se elevan los niveles de AMPc intracelulares (Blanco *et al.*, 2002; Nagy y Fekete, 2005). Este último activa una proteinquinasa A que fosforila los canales de cloro (CFTR) ubicados en la membrana apical de la célula. De este modo los canales se mantienen abiertos y se estimula la secreción de Cl⁻ desde las criptas intestinales. Asimismo, se inhibe la absorción de NaCl en las células del ápice de las vellosidades. El efecto final consiste en un aumento de la secreción de electrolitos y fluidos, acompañado por una disminución en su absorción (Nagy y Fekete, 2005). Las toxinas LT se dividen en dos serogrupos (LT-I y LT-II) (Nataro y Kaper, 1998) desde el punto de vista antigénico y biológico, aunque son similares estructuralmente (Nagy y Fekete, 2005). La toxina LT-I se expresa en cepas de humanos y animales, mientras que LT-II se encuentra, principalmente, en cepas de origen animal (Nataro y Kaper, 1998). Estudios realizados en Brasil describen la presencia de aislamientos productores de LT-II en terneros con diarrea (Salvadori *et al.*, 2003; Rigobelo *et al.*, 2006).

Las toxinas ST son pequeños polipéptidos (1,9-5 kDa) (Blanco *et al.*, 2002) solubles en metanol y estables al calor. Existen dos clases de toxinas (STa o ST-I y STb o ST-II) que difieren en su estructura y mecanismo de acción (Nataro y Kaper, 1998; Nagy y Fekete, 2005). La toxina STa es un péptido de 11-18 aa (2 kDa) (Nagy y Fekete, 2005) producido por las cepas ETEC de origen bovino (Blanco *et al.*, 2002) y porcino (Nagy y Fekete, 2005). Los genes codificantes para STa se ubican en plásmidos (Nataro y Kaper, 1998), formando parte de un transposón (Tn1681) (Nagy y Fekete, 2005). La toxina STa muestra actividad en el ensayo del ratón lactante (Nagy y Fekete, 2005) y su mecanismo de acción involucra el reconocimiento de una glicoproteína de transmembrana con actividad guanilato ciclasa (Nataro y Kaper, 1998; Nagy y Fekete, 2005), la cual aumenta los niveles de GMPc intracelular (Nataro y Kaper, 1998; Blanco *et al.*, 2002). El efecto de STa es reversible y se caracteriza por disminuir la absorción de agua y electrolitos (transporte de Na⁺ acoplado a Cl⁻) en el extremo de las vellosidades y por aumentar la secreción de Cl⁻ y agua desde las criptas. La secreción de Cl⁻ hacia la luz intestinal está mediada por la activación de los canales CFTR (Nataro y Kaper, 1998; Nagy y Fekete, 2005).

La variante STb es elaborada por cepas porcinas (Nataro y Kaper, 1998; Nagy y Fekete, 2005), aunque esporádicamente se han identificado cepas ETEC productoras de STb que fueron aisladas de terneros y pollos con de diarrea (Nagy y Fekete, 2005). Esta toxina está codificada por un gen plasmídico (Nataro y Kaper, 1998) que forma parte de un transposón (Tn 4521) (Nagy y Fekete, 2005). STb es sensible a proteasas y reconoce un receptor de glicolípido (sulfatido) presente en el epitelio intestinal. La toxina estimula la secreción de bicarbonato desde los enterocitos, pero no eleva los niveles de nucleótidos cíclicos. Este efecto es mediado por la apertura de canales de Ca^{+2} ligados a proteína G, los cuales facilitan su entrada desde el espacio extracelular (Nataro y Kaper, 1998).

ii) Fimbrias

Las fimbrias (o pili) son apéndices de tipo fibrilar o con forma de bastón, se ubican en la superficie bacteriana y están constituidas por proteínas (Vadillo Machota *et al.*, 2002; Gyles y Fairbrother, 2010). Cada fimbria presenta cientos de copias de una subunidad principal (Mainil, 2013), la cual le confiere la estructura y especificidad antigénica (Gyles y Fairbrother, 2010). Además, las fimbrias tienen subunidades menores que están presentes en un número reducido de copias (Gyles y Fairbrother, 2010; Mainil, 2013). Estas subunidades se ubican en la base de las fimbrias y cumplen una función de anclaje a la membrana externa (Mainil, 2013). También hay subunidades menores y específicas que tiene propiedades de adhesión (adhesinas). Estas se ubican en el extremo de cada fimbria como una copia única (Nagy y Fekete, 1999; Gyles y Fairbrother, 2010; Mainil, 2013) o en forma intercalada entre las subunidades principales (Mainil, 2013).

La fimbria F5 está presente en las cepas ETEC de bovinos, cerdos y corderos (Gyles y Fairbrother, 2010). Originalmente recibió la denominación de K99 porque se creía que era una cápsula, hasta que luego se demostró su estructura de apéndice fibrilar (5 nm de diámetro) (Isaacson, 1977; Nagy y Fekete, 2005; Gyles y Fairbrother, 2010). Esta fimbria se encuentra codificada por el locus *fan* plasmídico (Nagy y Fekete, 1999) y resiste a la inhibición de la manosa. La subunidad principal FanC también cumple con la función de adhesina. Esta última le permite unirse lateralmente a un receptor celular específico, el cual fue identificado como un glicolípido del ácido glicolilneurámico (NeuGC-GM3) (Nagy y Fekete, 2005; Gyles y Fairbrother, 2010). Este receptor media la adhesión de ETEC a la mucosa del intestino delgado posterior de los animales jóvenes y ocasionalmente de los adultos (Gyles y Fairbrother, 2010).

La fimbria F41 es un apéndice fibrilar codificado por genes cromosomales y se encuentra en algunas cepas ETEC de origen bovino y porcino. Esta fimbria tiene un diámetro de 3,2 nm y

es resistente a la manosa (Nagy y Fekete, 2005). Las cepas ETEC positivas para F41 suelen expresar F5 en forma conjunta y esto se observa, fundamentalmente, en las cepas de los serogrupos O9 y O101. La fimbria F41 favorece la colonización del intestino delgado posterior, aún en ausencia de la fimbria F5 (Gyles y Fairbrother, 2010). Por otra parte, la fimbria F17 también se ha encontrado en cepas ETEC (Contrepolis *et al.*, 1998), aunque el rol de estas cepas en la diarrea no ha sido aclarado (Gyles y Fairbrother, 2010).

c) Prevalencia de ETEC en terneros

Los estudios epidemiológicos realizados en Alemania (Wieler *et al.*, 2007), Argentina (Barrandeguy *et al.*, 1988; Picco *et al.*, 2015), Austria (Herrera-Luna *et al.*, 2009), Australia (Izzo *et al.*, 2011), Brasil (Salvadori *et al.*, 2003; Rigobelo *et al.*, 2006), España (Blanco y Blanco, 1993; de la Fuente *et al.*, 1998), EEUU (Moon *et al.*, 1976; Myers y Guinée, 1976; Cho *et al.*, 2013), Reino Unido (Sherwood *et al.*, 1983; Reynolds *et al.*, 1986; Snodgrass *et al.*, 1986), Suiza (Lanz Uhde *et al.*, 2008) y Turquía (Güler *et al.*, 2008; Ok *et al.*, 2009) demuestran la ocurrencia de infecciones por ETEC en terneros con diarrea.

La prevalencia de ETEC en terneros diarreicos es muy variable. Mediante la utilización del cultivo bacteriológico y la aglutinación con antiseros específicos para F5, se estimaron prevalencias del 0,7% (Herrera-Luna *et al.*, 2009), 1% (3/244) (Blanco y Blanco, 1993), 3% (9/310) (Reynolds *et al.*, 1986), 5,5% (Lanz Uhde *et al.*, 2008), 7,3% (8/109) (Snodgrass *et al.*, 1986), 7,5% (Sherwood *et al.*, 1983) y 12% (de la Fuente *et al.*, 1998). Por otro lado, las prevalencias en terneros sin diarrea suelen ser menores y alcanzan el 0,6% (1/166) (Reynolds *et al.*, 1986) y 4% (Blanco y Blanco, 1993), aunque a veces no se detectan portadores (Snodgrass *et al.*, 1986). Los resultados de estas investigaciones indican que la circulación de ETEC es poco frecuente (Reynolds *et al.*, 1986; Snodgrass *et al.*, 1986; Blanco y Blanco, 1993; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Herrera-Luna *et al.*, 2009). Además, el número de establecimientos con casos de DNT asociada a ETEC suele ser reducido, habiéndose registrado frecuencias relativas del 1,4% (8/70) (Sherwood *et al.*, 1983), 4% (2/45) (Reynolds *et al.*, 1986) y 12,9% (4/31) (Snodgrass *et al.*, 1986).

A pesar de lo mencionado, algunos estudios registran valores de prevalencia mayores. En tambos de una región lechera de Argentina se determinó una prevalencia del 30% en terneros diarreicos y del 23% en terneros sin diarrea. Las técnicas de diagnóstico utilizadas en dicho trabajo incluyeron el ensayo del ratón lactante (STa) y el cultivo en agar Minca-Is seguido por la prueba de aglutinación para detectar F5 (Barrandeguy *et al.*, 1988). En un estudio longitudinal realizado en Alemania se evaluó la presencia de ETEC en 211 terneros (1-12 semanas de vida)

que procedían de 11 granjas. La identificación de ETEC se realizó por PCR para detectar los genes *est* (STa) y *elt* (LT); la prevalencia estimada para *E. coli est*⁺ fue del 31,7% (Wieler *et al.*, 2007). Es posible que el tipo de muestreo y la técnica utilizada (PCR) hayan facilitado la detección de ETEC. Sin embargo, una investigación reciente en Iowa (EEUU) utilizó una PCR múltiple y en tiempo real para detectar *E. coli* F5⁺ en terneros con diarrea y se estableció una prevalencia de sólo el 4% (8/199) (Cho *et al.*, 2013).

f) Diagnóstico de ETEC

Para realizar el diagnóstico de diarrea por ETEC se necesita aislar e identificar una cepa de *E. coli* F5⁺ productora de STa (Butler y Clarke, 1994). Sin embargo, en los aislamientos ETEC de bovinos existe una muy buena relación entre la presencia de F5 y la capacidad para producir STa y distender las asas intestinales. Por ello, el diagnóstico de ETEC suele basarse en la identificación del Ag F5 (K99) (Sherwood *et al.*, 1983). No obstante, la detección de toxinas y fimbrias puede realizarse por métodos fenotípicos o moleculares (genotípicos) (Nataro y Kaper, 1998).

La presencia de LT se ha demostrado por la técnica de coagulación estafilocócica (Blanco y Blanco, 1993) y a partir de los cambios morfológicos en las líneas celulares Vero, Y1 y CHO (Blanco y Blanco, 1993; Nataro y Kaper, 1998). La producción de STa se puede evaluar en el ensayo del ratón lactante (Moon *et al.*, 1976; Nataro y Kaper, 1998), mientras que la elaboración de STb puede analizarse en asas ligadas de intestino de conejo y cerdo (Blanco y Blanco, 1993). En cuanto a la detección de fimbrias, aún se emplean los métodos inmunológicos (Nataro y Kaper, 1998; Valat *et al.*, 2014). Uno de ellos consiste en cultivar los aislamientos en medios específicos (agar Minca-Iso o TGX) que estimulan la expresión de fimbrias (Snodgrass *et al.*, 1986; Bellinzoni *et al.*, 1990; de la Fuente *et al.*, 1998) y luego se realiza una prueba de aglutinación en portaobjetos con antisueros policlonales específicos para F5 y F41 (Moon *et al.*, 1976; Campero *et al.*, 1985; Reynolds *et al.*, 1986). Otros métodos incluyen el ELISA (de la Fuente *et al.*, 1998; Izzo *et al.*, 2011) y la aglutinación con partículas de látex (Nataro y Kaper, 1998).

Los métodos moleculares basados en la hibridación con sondas y la PCR permiten detectar secuencias específicas de ADN (Blanco *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 1998; Nataro y Kaper, 1998) y los laboratorios de diagnóstico han incorporado estos métodos para identificar los genes de virulencia de ETEC (Frank *et al.*, 1998; Nagy y Fekete, 2005). Sin embargo, los métodos clásicos (cultivos celulares, ELISA e IF) también son necesarios, ya que permiten evaluar la expresión génica (Nagy y Fekete, 2005).

5.6.2 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

a) Definiciones

EPEC es una de las causas más comunes de diarrea infantil en los países en desarrollo (Nataro and Kaper, 1998) y también afecta a diferentes especies de animales, principalmente conejos, perros y cerdos (Gyles y Fairbrother, 2010). EPEC se caracteriza por producir la lesión de adherencia y borrado (A/E) (*attaching and effacing*) (Moon *et al.*, 1983; Wales *et al.*, 2005; Schmidt, 2010), pero no elabora enterotoxinas ni verotoxinas (Clarke *et al.*, 2003; Schmidt, 2010) y no presentan una invasividad comparable a la de *Shigella* (Clarke *et al.*, 2003).

Las proteínas involucradas en la lesión de A/E están codificadas por genes agrupados dentro del locus LEE (Clarke *et al.*, 2003; Gyles y Fairbrother, 2010) y *eae* (codifica intimina) fue el primero en descubrirse (Clarke *et al.*, 2003). En la bibliografía internacional se utilizan las denominaciones *eae*⁺ no-VTEC (Orden *et al.*, 1999) o EPEC (China *et al.*, 1998; Wani *et al.*, 2007) para referirse a las cepas bovinas que presentan el genotipo de virulencia *eae*⁺; en esta tesis utilizaremos el término EPEC. Asimismo, las cepas EPEC se clasifican en típicas o atípicas de acuerdo a la presencia o ausencia del plásmido EAF (EPEC *adherence factor*), respectivamente. En este plásmido se ubican los genes codificantes para la fimbria Bfp (*bundle forming pilus*) (Clarke *et al.*, 2003; Schmidt, 2010).

Dado que las cepas EPEC se caracterizan por producir la lesión de A/E (Nataro y Kaper, 1998), este patotipo se incluye dentro de un grupo o categoría denominado *E. coli* de adherencia y borrado (AEEC) (*attaching and effacing E. coli*). Las cepas VTEC positivas al locus LEE (generalmente EHEC) también forman parte del grupo AEEC (Gyles y Fairbrother, 2010) (ver Definiciones, apartado 5.6.3). Los bovinos, ovinos y cerdos sanos parecen ser reservorios de cepas EPEC atípicas (*eae*⁺, *bfpA*⁻), mientras que en perros y gatos se han aislado cepas EPEC típicas (*eae*⁺, *bfpA*⁺) (Gyles y Fairbrother, 2010). Las EPEC bovinas se pueden clasificar dentro de los serotipos O18:H7, O26:H11, O123, O123:H11, O127:H40, O145, O177:H11 (Aidar Ugrinovich *et al.*, 2007), O2, O15, O75 y O117 (Wani *et al.*, 2007).

b) Factores de virulencia y genes codificantes

i) Bfp

El plásmido EAF presenta un *cluster* de 14 genes necesarios para la formación de la fimbria Bfp (Chen y Frankel, 2005; Wales *et al.*, 2005) y la subunidad principal (BfpA) se encuentra codificada por el gen *bfpA* (Chen y Frankel, 2005). Este plásmido (60 MDa) permite que las cepas EPEC desarrollen un patrón de adherencia localizada (LA) en los cultivos de

células HEp-2 (Nataro y Kaper, 1998; Clarke *et al.*, 2003). La fimbria Bfp es considerada como un factor de virulencia muy importante (Chen y Frankel, 2005), ya que favorece la adhesión entre bacterias (microcolonias) durante la adherencia localizada (Nataro y Kaper, 1998) y es posible que participe en la unión a las células epiteliales (Kaper *et al.*, 2004).

ii) Locus LEE

La capacidad de EPEC para producir la lesión característica de A/E (Chen y Frankel, 2005) se debe a la presencia de una isla de patogenicidad (35,6 kb) cromosomal (LEE, *locus of enterocyte effacement*) (Clarke *et al.*, 2003; Wales *et al.*, 2005), la cual no se habría originado a partir de *E. coli* (Wales *et al.*, 2005; Schmidt, 2010). Los genes involucrados en la lesión de A/E y en la formación del pedestal se ubican dentro del locus LEE (Clarke *et al.*, 2003; Schmidt, 2010). La lesión de A/E se puede observar por ME de transmisión (Wales *et al.*, 2005) y se caracteriza por la presencia de bacterias adheridas íntimamente a la membrana de los enterocitos (Fig. 9.1) (Wales *et al.*, 2005; Schmidt, 2010). Posteriormente, se produce el borrado de las microvellosidades y un reordenamiento del citoesqueleto por debajo de la bacteria adherida, el cual consiste en la acumulación de filamentos de actina. Como consecuencia de ello se forma una estructura de pedestal que aleja a la bacteria de la superficie celular (Fig. 9.1) (Chen y Frankel, 2005; Wales *et al.*, 2005; Schmidt, 2010). Este fenómeno es considerado como uno de los sellos en la patogenicidad de AEPEC (Schmidt, 2010).

El locus LEE de las cepas EPEC presenta 41 ORFs (Schmidt, 2010) organizados en cinco operones grandes y policistrónicos (LEE1-LEE5) y en un número menor de unidades transcripcionales (Wales *et al.*, 2005; Schmidt, 2010). Dentro del operón LEE5 se ubican los genes que codifican la intimina (*eae*) (*enterocyte attaching and effacing*) y su receptor denominado Tir (*tir*) (*translocated intimin receptor*) (Wales *et al.*, 2005). La intimina activa las vías de transducción de señales que conducen a un remodelado de la superficie celular y a la formación del pedestal. Los últimos 280 aa del extremo carboxilo-terminal de la intimina (conocido como Int280) son responsables de la unión al receptor y esta región presenta una considerable variación entre los distintos tipos de intimina, aunque algunos residuos de triptofano están muy conservados entre las cepas EPEC. Por lo tanto, las secuencias de *eae* tienen bastante variación, dando lugar a la existencia de variantes que se designan con letras griegas (Clarke *et al.*, 2003).

iii) Sistema de secreción de tipo III

El sistema de secreción de tipo III (TTSS) participa, exclusivamente, en la virulencia bacteriana y cumple la función de secretar proteínas. Aproximadamente, un total de 10 genes están implicados en la formación del TTSS (Clarke *et al.*, 2003) y se ubican en el corazón del locus LEE (Schmidt, 2010). Originalmente se denominaron *sep* (*secretion of EPEC proteins*) pero actualmente reciben el nombre de *esc* (*EPEC secretion*) para mantener la nomenclatura de los TTSS presentes en otras bacterias (Clarke *et al.*, 2003).

iv) Proteínas secretadas y efectoras

Las proteínas secretadas EspA (25 kDa), EspB (37 kDa) y EspD (39 kDa) fueron las primeras en caracterizarse y los genes que las codifican se ubican en el operón LEE4. Durante los estadios iniciales de la infección, EspA forma apéndices filamentosos que se extienden desde la bacteria hacia la célula huésped. Estos filamentos se asocian al TTSS y ambos forman una estructura (“jeringa molecular”) que permite translocar proteínas efectoras al interior de la célula huésped. Las proteínas EspB y EspD pasan a través de EspA y forman un poro en la membrana de la célula hospedadora (Fig. 9.1) (Clarke *et al.*, 2003).

Las proteínas efectoras (Tir, Map, EspB, EspF, EspH, EspZ y EspG) son inyectadas dentro del citoplasma de la célula y allí modifican el citoesqueleto y los procesos de señalización celular (Schmidt, 2010). Además de su función translocadora, EspB se comporta como una toxina para el citoesqueleto ya que redistribuye la actina (Clarke *et al.*, 2003). La proteína Tir (78 kDa) cumple con la función de receptor para intimina en la célula huésped (Clarke *et al.*, 2003; Schmidt, 2010). La unión entre la intimina y el receptor Tir es necesaria para producir la lesión de A/E (Wales *et al.*, 2005). Para que esto suceda, el receptor se transloca dentro de la célula huésped, se ubica en la membrana apical (Clarke *et al.*, 2003; Schmidt, 2010) y sufre reacciones de fosforilación mediadas por enzimas celulares. La fosforilación de un residuo de tirosina es un paso necesario para la acumulación de actina y la formación del pedestal (Fig. 9.1) (Clarke *et al.*, 2003), ya que dicho proceso activa la vía Nck y crea un sitio de acoplamiento y activación de las proteínas WASP (Schmidt, 2010). Luego de producida esta modificación, el receptor Tir expone su sitio de unión para la intimina a nivel extracelular (Fig. 9.1) (Clarke *et al.*, 2003). Las proteínas EspF y Map afectan las uniones celulares e inducen apoptosis, mientras que el borrado de las microvellosidades depende de la acción de Map, Tir y EspF. Además, las proteínas EspH y EspJ antagonizan la fagocitosis mediada por opsonina en los macrófagos (Schmidt, 2010).

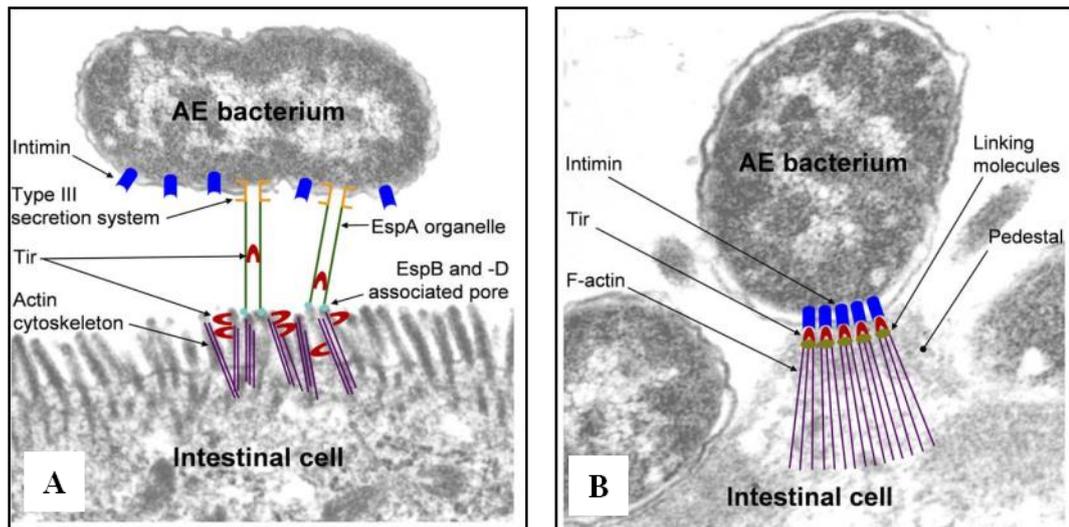


Fig. 9.1. El diagrama ilustra algunos mecanismos que participan en la formación de la lesión de A/E. (A) Adhesión no íntima entre bacteria y célula, seguido por la translocación de proteínas. EspA, -B y -D son exportadas por el sistema de secreción (TTSS) y forman una organela bifuncional, ya que permite la adhesión de la bacteria y la translocación del receptor Tir dentro de la célula huésped. (B) Adhesión íntima. El receptor Tir centra los filamentos de actina (F), forma un pedestal y se une a la intimina en la membrana externa de la bacteria. Fuente: Wales *et al.*, 2005

c) Prevalencia de EPEC en terneros

Diferentes estudios han evaluado la prevalencia de *E. coli eae*⁺ en terneros diarreicos y sin diarrea (China *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1999; Wani *et al.*, 2007; Ok *et al.*, 2009) o exclusivamente en terneros con diarrea (Orden *et al.*, 1999; Aidar *et al.*, 2000). Un estudio realizado con terneros de tambo (Michigan, EEUU) demostró una mayor frecuencia de aislamientos de *E. coli eae*⁺ (*vtx*⁻, algunos *Ehly*⁺) en terneros sanos (20%; 20/101) con respecto a aquellos diarreicos (10,5%; 12/114) ($p = 0,001$) (Holland *et al.*, 1999). Coincidentemente, una investigación desarrollada en Bélgica determinó que la frecuencia de *E. coli eae*⁺ fue mayor en terneros sanos (24%; 75/311) con respecto a los terneros muertos por diarrea (5%; 15/295). La frecuencia de colonias *eae*⁺ fue del 1,6% (16/970) en terneros necropsiados con diarrea y del 13% (171/1322) en terneros sanos que provenían de establecimientos sin problemas serios de diarrea. Cuando el estudio se realizó longitudinalmente en 7 granjas (2 muestreos/semana durante 3 meses), el 36,8% (429/1164) de las muestras y el 89% (79/89) de los terneros resultaron positivos a *E. coli eae*⁺. De acuerdo a la condición clínica, el 66% de los terneros con diarrea y el 25% de los terneros sin diarrea fueron positivos. El 90% de las muestras positivas se obtuvieron de terneros de 2-8 semanas de vida (5 semanas en promedio) (China *et al.*, 1998). En Brasil, la frecuencia relativa de EPEC fue del 2,6% (7/264) en terneros con diarrea y del 2,8% (8/282) en terneros sin diarrea (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007).

f) Diagnóstico

El método definitivo para confirmar las lesiones de A/E se basa en la observación de la apariencia ultraestructural por ME de transmisión. Sin embargo, estas lesiones también se pueden evidenciar en los cultivos celulares mediante la tinción de FAS (*fluorescent actin staining*) seguida por la observación en un microscopio de fluorescencia (Wales *et al.*, 2005). Esta tinción utiliza una toxina fúngica (faloidina) específica para la actina y de esta manera se logra marcar los agregados de actina en los sitios de adhesión íntima entre las células y bacterias (Clarke *et al.*, 2003; Wales *et al.*, 2005). También se pueden utilizar técnicas moleculares como la hibridación con sondas (Saridakis *et al.*, 1997) o la PCR (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007; Wani *et al.*, 2007) para detectar genes de virulencia (*eae* y *bfpA*) y el plásmido EAF (Nataro y Kaper, 1998).

5.6.3 *E. coli* verotoxigénica (VTEC)

a) Definiciones

Las verotoxinas (VT) son potentes citotoxinas que causan un efecto citopático e irreversible en las células Vero (Agbodaze, 1999; Blanco *et al.*, 2002). Sin embargo, las VTs están relacionadas estructural e inmunológicamente con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Blanco *et al.*, 2002); por ello también reciben el nombre de toxinas Shiga (Stx) (Mainil, 2013). Las designaciones VT o Stx deben considerarse como sinónimos (Mainil, 1999), al igual que los acrónimos VTEC y STEC utilizados para denominar a las cepas de *E. coli* productoras VT y Stx, respectivamente (Mainil, 1999). Si bien ambos acrónimos están reconocidos internacionalmente, en este trabajo de tesis utilizaremos VTEC.

El término *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) se utiliza para designar a un subgrupo de cepas VTEC (Nataro y Kaper, 2004) que comparten características clínicas, patogénicas y epidemiológicas con la cepa prototipo *E. coli* O157:H7 (Blanco y Blanco, 1993; Agbodaze, 1999). El criterio utilizado para considerar a una cepa como EHEC incluye los siguientes atributos: su asociación con enfermedad (diarrea, CH y SUH) (Blanco y Blanco, 1993; Mainil, 1999; Naylor *et al.*, 2005), la producción de una o más VTs, la presencia de plásmidos (60 MDa, 91, 2 kb aprox.) con genes que codifican la enterohemolisina (Ehly o EHEC-hly) (Mainil, 1999; Blanco *et al.*, 2002; Naylor *et al.*, 2005) y su capacidad para inducir lesiones de A/E (Agbodaze, 1999). En general estas cepas pertenecen a ciertos serotipos (O157:H7, O157:H-, O26:H11, O26:H-, O111:H-, O113:H21, O103:H2, entre otros) (Mainil, 1999; Blanco *et al.*, 2002). El término EHEC también se utiliza para designar a cepas bovinas con características similares (Stordeur *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2005; Badouei *et al.*, 2010; Mainil, 2013).

Los rumiantes, y principalmente los bovinos, constituyen el principal reservorio de VTEC (Borczyk *et al.*, 1987; Paton y Paton, 1998a; Blanco *et al.*, 2002), ya que forman parte de la microbiota normal del intestino (Blanco y Blanco, 1993) y sus heces representan la principal fuente de infección (Agbodaze, 1999). No obstante ello, existen evidencias suficientes para considerar a VTEC como un patógeno de los cerdos y terneros (Agbodaze, 1999). Las cepas EHEC (VTEC) asociados a diarrea y disentería en terneros se caracterizan por producir la lesión A/E (Hall *et al.*, 1985; Moxley y Francis, 1986; Chanter *et al.*, 1986; Schoonderwoerd *et al.*, 1988; Doll, 2005). Debido a esta última característica, las cepas EHEC bovinas se clasifican dentro del grupo AEEC (ver Definiciones, apartado 5.6.2) (Schoonderwoerd *et al.*, 1988; Blanchard, 2012) junto con las cepas EPEC. Por lo tanto, las cepas del grupo AEEC poseen factores de virulencia y presentan serogrupos que permiten clasificarlas como EHEC y EPEC. Actualmente, se considera que AEEC puede ser una causa de diarrea y disentería en terneros (Doll, 2005; Radostitis *et al.*, 2007; Moxley y Smith, 2010; Blanchard, 2012; Izzo *et al.*, 2015) y la participación de EHEC como causa de enfermedad se ha demostrado en condiciones naturales (Schoonderwoerd *et al.*, 1988; Gunning *et al.*, 2001; Wani *et al.*, 2005) y experimentales (Dean Nystrom *et al.*, 1997, 1998; Stordeur *et al.*, 2000) en terneros neonatos. Además, los casos de enfermedad ocurridos en forma natural demuestran la presencia de lesiones histopatológicas y la lesión de A/E observada por ME en la mucosa intestinal (Schoonderwoerd *et al.*, 1988; Gunning *et al.*, 2001, Wani *et al.*, 2004; Wani *et al.*, 2005).

b) Factores de virulencia y genes codificantes

i) Verotoxinas

Las verotoxinas (VTs) son de naturaleza proteica y producen un efecto citotóxico e irreversible en las células Vero. Las VTEC pueden elaborar dos tipos de toxinas, las cuales se agrupan en familias: verotoxina 1 (VT1, también designada Stx1 o SLT-1) y verotoxina 2 (VT2, también denominada Stx2 o SLT-2) (Paton y Paton, 1998a; Agbodaze, 1999; Mainil, 2013). La toxina VT1 está relacionada biológica, estructural y antigénicamente con la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (ShT) (Paton y Paton, 1998a) y no es neutralizada por los Ac desarrollados frente a VT2 (Agbodaze, 1999). Las secuencias deducidas de aa indican que las toxinas VT1 y ShT son casi idénticas y hay sólo un aa de diferencia en la subunidad A (Paton y Paton, 1998a). Existen 3 subtipos de VT1 que se denominan VT1a, VT1c, VT1d (Mainil, 2013). En cambio, la toxina VT2 tiene un 56% de identidad con VT1 y ShT (Paton y Paton, 1998a) y presenta 7 subtipos (VT2a, VT2b, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f y VT2g) (Scheutz *et al.*, 2012).

Las VTs (70 kDa) están formadas por una subunidad A (32-kDa) con actividad catalítica y por cinco monómeros (7,7 kDa, cada uno) que constituyen la subunidad B; esta última cumple la función de adherirse al receptor celular (Paton y Paton, 1998a). La mayoría de las VTs están codificadas por genes ubicados en bacteriófagos y las cepas de *E. coli* pueden adquirirlos o perderlos (Paton y Paton, 1998a; Mainil, 2013). Las VTs se encuentran codificadas por un solo operón que tiene la siguiente organización: péptidos señal de las subunidades A (66 pb) y B (60 y 57 pb), subunidad A (879 pb para VT1; 891 pb para VT2), región intergénica (9-12 pb) y subunidad B (207 pb para VT1; 204 y 210 pb para VT2) (Scheutz *et al.*, 2012). Las células eucariotas (enterocitos y endoteliales) tienen un receptor de globotriosilceramida (Gb3) (Gal α [1-4]Gal β [1-4]Glc-ceramida) que es reconocido por la subunidad B (Paton y Paton, 1998a; Agbodaze, 1999; Fairbrother y Gyles, 2010). Una vez que la subunidad B se fija al receptor, las toxinas ingresan a la célula por endocitosis. Luego, siguen un transporte retrógrado (en vesículas endocíticas) a través del aparato de Golgi y se dirigen hacia el retículo endoplásmico. Allí una proteasa escinde la subunidad A y genera el fragmento A1 (extremo N terminal, 27-kDa) que tiene actividad catalítica (N-glicosidasa) (Paton y Paton, 1998a). Este último se transloca hacia el citoplasma e interacciona con el ARNr 28S removiendo un residuo de adenina. De esta forma se produce una inhibición irreversible de la síntesis proteica (terminación de la cadena peptídica) durante la etapa en que el aminoacil-ARNt se une al sitio aceptor del ribosoma (Fairbrother y Gyles, 2010).

ii) Locus LEE

Las cepas VTEC clasificadas como EHEC poseen un mecanismo especial de adhesión y producen la lesión de A/E (Paton y Paton, 1998a). Esta última se caracteriza por la desaparición de las microvellosidades del enterocito y la adhesión íntima de la bacteria a la célula (McDaniel *et al.*, 1995; Paton y Paton, 1998a). Los genes implicados en el desarrollo de la lesión de A/E se ubican en la isla de patogenicidad cromosomal LEE (35 kb) (Paton y Paton, 1998a; Schmidt, 2010). El locus LEE de EHEC se considera homólogo al de EPEC y presenta los genes que codifican las proteínas del TTSS (genes *sepA-sepI*), las proteínas involucradas en la adherencia íntima (Tir e intimina) y las proteínas secretadas (EspA, EspB y EspD). Estas últimas participan en la transducción de señales dentro de la célula (Paton y Paton, 1998a; Fairbrother y Gyles, 2010). La proteína EspB sería la responsable de alterar el citoesqueleto de la célula huésped y participaría en el borrado de las microvellosidades (Kaper *et al.*, 1998).

El gen *eae* es un componente crítico del locus LEE (Fairbrother y Gyles, 2010) y su producto es una proteína de la membrana externa (94 kDa) denominada intimina (Eae) (Jerse

et al., 1991; Fairbrother y Gyles, 2010; Mainil, 2013). La intimina (934 aa) de EHEC tiene una identidad del 83% con respecto a la secuencia de aa de la intimina de EPEC. Sin embargo, los genes *eae* de EPEC y EHEC son funcionalmente homólogos. La intimina es responsable de la adhesión íntima entre la bacteria y el enterocito (Paton y Paton, 1998a), pero para que ello ocurra se necesita el receptor Tir. Esta última proteína se transporta hacia el citoplasma de la célula a través del TTSS y reaparece en la superficie celular donde actúa como receptor (Fairbrother y Gyles, 2010).

iii) Plásmidos

EHEC O157 presenta un megaplásmido de virulencia (pO157, 90 Kb) que codifica 35 proteínas, las cuales estarían involucradas en la patogénesis de EHEC. El operón *Ehly* codifica la enterohemolisina (Ehly) y se ubica en dicho plásmido, por lo tanto es considerado como uno de los mejores marcadores genéticos para demostrar su presencia. pO157 también presenta un sistema de secreción de tipo II y otros factores de virulencia potenciales, entre ellos una catalasa-peroxidasa (*katP*) y una serina-proteasa (*espP*). Además, este plásmido es dinámico ya que presenta elementos genéticos móviles (transposones, profagos y partes de otros plásmidos), lo cual determina que estén desigualmente distribuidos entre las cepas O157:H7. Sin embargo, el operón *Ehly* y el sistema de secreción de tipo II están presentes en casi la totalidad de las cepas pertenecientes a este serotipo (Caprioli *et al.*, 2005).

La mayoría de las cepas EHEC no-O157:H7 también presentan plásmidos grandes (pEHEC) (60 MDa, 91, 2 kb aprox.) y similares a pO157 (Levine *et al.*, 1987; Caprioli *et al.*, 2005), los cuales usualmente portan el operón *Ehly* (Caprioli *et al.*, 2005) e hibridan con la sonda CDV 419 (Levine *et al.*, 1987). En un estudio se encontró que la mayoría de las cepas O157:H7 (99%), O26:11 (77%) y no-O157/O26:H1 (81%) asociadas a CH y SUH en humanos hibridaron con la sonda CDV 419 (Levine *et al.*, 1987). Las cepas VTEC (EHEC) carecen del plásmido EAF y por lo tanto no presentan los genes que codifican Bfp (Paton y Paton, 1998a).

iv) Enterohemolisina

El megaplásmido pO157 presenta los genes codificantes para una hemolisina de 107 kDa que se denomina enterohemolisina (EHEC-Hly o Ehly) (Beutin *et al.*, 1996; Paton y Paton, 1998a). Estos genes se agrupan formando un operón (*Ehly*) que consta de 4 ORFs (EHEC-*hlyCABD*) y su secuencia tiene una homología aproximada del 60% con respecto al operón de la α -hemolisina (*hlyCABD*); sin embargo este último se ubica en el cromosoma bacteriano (Paton y Paton, 1998a).

Las cepas productoras de Ehly no causan hemólisis en el agar sangre estándar, aunque forman zonas hemolíticas, turbias y pequeñas, en los cultivos de agar sangre (18-24 h) preparados con eritrocitos lavados de ovino y suplementados con Ca^{+2} (Beutin *et al.*, 1989; Paton y Paton, 1998a). La Ehly se encuentra en casi todas las cepas O157:H7 y también tiene una amplia distribución entre las cepas VTEC no-O157:H7 (Beutin *et al.*, 1989; Beutin *et al.*, 1996). El rol de la Ehly en la patogénesis de la enfermedad está sujeto a especulación. Posiblemente, la lisis de los eritrocitos facilitaría la liberación de hemoglobina, aportando hierro dentro del intestino para estimular el crecimiento de VTEC (Nataro y Kaper, 1998; Paton y Paton, 1998a); también se demostró que esta toxina produce la lisis de leucocitos bovinos (Nataro y Kaper, 1998).

c) Prevalencia de VTEC en terneros

En Argentina, hasta el momento, no hay estudios que confirmen la participación de EHEC como causa de diarrea o disentería en terneros mediante la utilización conjunta de técnicas moleculares, serotipificación, histopatología y ME. No obstante, se han realizado estudios epidemiológicos en los cuales se estableció la frecuencia relativa o prevalencia de VTEC. Un estudio determinó que la frecuencia de VTEC en terneros con y sin diarrea fue del 26,9% (34/126) (Sanz *et al.*, 1998). Posteriormente, Mercado y cols. identificaron aislamientos VTEC en el 15,8% (12/76) de los terneros diarreicos procedentes de tambos y campos de cría (Mercado *et al.*, 2004). Más recientemente, una investigación estableció una prevalencia del 43% (108/252) para VTEC en terneros de tambo procedentes de la cuenca lechera Mar y Sierras, aunque no se especificó la condición clínica de los animales muestreados (Fernández *et al.*, 2009).

Diversos estudios han evaluado la relación entre la detección VTEC (EHEC) y la presencia de diarrea en terneros, aunque los resultados son discrepantes. En Argentina, Sanz y cols. no hallaron ninguna asociación entre la condición clínica de los terneros y la detección de VTEC, siendo su frecuencia similar en terneros sanos (29%; 24/83) y diarreicos (23% 10/43) (Sanz *et al.*, 1998). Asimismo, en Brasil, la prevalencia de VTEC en terneros de carne con diarrea fue del 12% (31/264) y en terneros sin diarrea del 8,5% (24/282), aunque en dicho estudio se incluyeron animales hasta los 6 meses de vida (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007).

En cambio, otras investigaciones encontraron una mayor frecuencia de VTEC (y posiblemente EHEC) en terneros diarreicos en comparación con aquellos sin diarrea (Mohammad *et al.*, 1985; Wieler *et al.*, 1992; Leomil *et al.*, 2003). En India, el 27% (21/78) de los terneros con diarrea excretaron VTEC, mientras que el 10% (4/40) de los terneros sin diarrea

(en contacto con diarreicos) y el 6% (3/54) de los terneros sanos y sin exposición reciente a casos de diarrea resultaron positivos a VTEC. Por lo tanto, la frecuencia de VTEC en terneros diarreicos fue mayor a la observada en terneros sanos ($X^2 = 9,64$; $p < 0,01$) (Mohammad *et al.*, 1985). En Brasil, la frecuencia de aislamientos VTEC fue mayor en las muestras de terneros diarreicos (20%, 28/139) con respecto a las muestras de aquellos sin diarrea (7,8%, 16/205) ($p < 0,001$) (Leomil *et al.*, 2003). Por otra parte, en Alemania, Wieler y cols. hallaron que el 17,8% (13/73) de los terneros con diarrea y el 5% (5/101) de los terneros sin diarrea excretaban VTEC (*vtxI*⁺). Asimismo, el porcentaje promedio de colonias *vtxI*⁺ fue mayor en los terneros diarreicos (47,3%) con respecto a los terneros sin diarrea (9%) ($p < 0,05$) (Wieler *et al.*, 1992).

En cuanto a otros genes de virulencia, en nuestro país se detectó el genotipo *eae+vtxI* en el 73% (35/48) de los aislamientos VTEC de terneros sin diarrea (Sanz *et al.*, 1998), mientras que el 80% (12/15) (Mercado *et al.*, 2004) y 100% (11/11) (Sanz *et al.*, 1998) de los aislamientos VTEC de terneros con diarrea presentaron dicho genotipo. En otros países, la detección de *eae* a partir de aislamientos VTEC fue del 41,6% (10/24) (Leomil *et al.*, 2003) y 55,8% (24/43) (Orden *et al.*, 1998). En el caso particular de los serogrupos O26 y O111, la presencia de *eae* puede alcanzar el 69% (65/94) de los aislamientos VTEC (Lee *et al.*, 2008). En Alemania, un estudio encontró que la producción simultánea de VT y Ehly fue claramente superior en los aislamientos VTEC de terneros diarreicos (73,9%) con respecto a los aislamientos de terneros sanos (23,1%) (Wieler *et al.*, 1992).

f) Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de la diarrea o disentería por VTEC (EHEC) se basa en: i) el aislamiento de cepas VTEC a partir de las heces, ii) los aislamientos deberían pertenecer a un serotipo de EHEC (incrementa su importancia) y iii) la observación de lesiones en intestino grueso y delgado, tanto a nivel macroscópico como microscópico, son un buen indicio para diagnosticar la enfermedad (Butler y Clarke, 1994). El diagnóstico de infecciones por VTEC se basa en la detección de genes (*vtxI* y *vtx2*) o toxinas (VT) a partir de cultivos o extractos fecales y del aislamiento de cepas VTEC. La prueba de citotoxicidad en células Vero es el *gold standard* para confirmar la presencia de aislamientos verotoxigénicos. Sin embargo, esta técnica es laboriosa, demanda tiempo y no es práctica. Por ello se han desarrollado diferentes protocolos de ELISA indirecto para la detección de VT1 y VT2 en cultivos fecales. A su vez, estos inmunoensayos permiten confirmar la producción de VTs cuando no se dispone de cultivos celulares (Paton y Paton, 1998a).

Otra técnica muy utilizada es la amplificación por PCR de los genes codificantes para VTs a partir de lisados crudos y extractos de ADN, los cuales se obtienen de colonias individuales, caldos de cultivo mixto o directamente de las heces y alimentos (Paton y Paton, 1998a). Muchos ensayos de PCR combinan pares de *primers* que permiten detectar *vtx1* y *vtx2* en forma simultánea (Frank *et al.*, 1998; Paton y Paton, 1998b). Algunas ventajas de la PCR incluyen su alta sensibilidad y la capacidad para detectar ambos genes en muestras que tienen bacterias no viables. También se han desarrollado protocolos de PCR para detectar otros genes de virulencia (*eae* y EHEC-*hlyA*) (Paton y Paton, 1998b).

5.6.4 *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC)

a) Definición

Las cepas de *E. coli* con capacidad especial para causar enfermedades fuera del tracto digestivo se denominan *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) (Russo y Johnson, 2000; Johnson y Russo, 2002). Esta designación es muy utilizada para identificar a las cepas aisladas de casos de enfermedad en humanos y se ha comenzado a emplear en medicina veterinaria (DebRoy *et al.*, 2008; Carvallo *et al.*, 2010), aunque algunos autores las denominan *E. coli* septicémica (SePEC) (Gyles y Fairbrother, 2010; Mainil, 2013). En esta tesis utilizaremos, indistintamente, los acrónimos SePEC o tipo-ExPEC para hacer referencia a los aislamientos que portan GV característicos de las cepas septicémicas de bovinos. La decisión de no utilizar el término ExPEC se basó en dos principios. Primero, no se evaluaron todos los factores de virulencia que se utilizan para definir como ExPEC a una cepa aislada de humanos. Por ejemplo, no se analizaron las fimbrias S (*sfa*) y F1C (*foc*), la adhesina Dr (*dra*) y el polisacárido capsular (*kpsMT II*) (Johnson *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007). No obstante, ciertos estudios con cepas bovinas no lograron demostrar su presencia (Girardeu *et al.*, 2008; Ghanbarpour y Oswald, 2009) o la frecuencia de su detección ha sido irrelevante (Wu *et al.*, 2012). Segundo, algunos GV evaluados en esta tesis (*f17G* y *clpG*) no suelen utilizarse para clasificar como ExPEC a las cepas humanas (Johnson *et al.*, 2003).

E. coli es una de las principales causas de bacteriemia, septicemia, infecciones del tracto urinario (ITU) y meningitis en diferentes especies de animales (Aldridge *et al.*, 1993; Fecteau *et al.*, 1997; Radostitis *et al.*, 2007; Fecteau *et al.*, 2009; Kireççi *et al.*, 2010). En medicina humana no se considera a ExPEC como una causa de enfermedad gastrointestinal (Johnson y Russo, 2002), dado que este tipo de cepas establece una colonización prolongada y asintomática del intestino, pasando a formar parte de la microbiota comensal (Johnson y Russo, 2002; Köhler y Dubrint, 2011). Un vez que dichas cepas acceden a sitios fuera del tracto digestivo, son capaces

de causar distintas enfermedades (Köhler y Dubrint, 2011). En medicina veterinaria, sin embargo, algunos autores consideran que la diarrea puede estar presente en los estadios finales de la septicemia por *E. coli* (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009) y viceversa, los terneros con diarrea suelen desarrollar bacteriemia y septicemia por *E. coli* (Aldridge *et al.*, 1993; Fecteau *et al.*, 1997). Por lo tanto, algunas investigaciones han evaluado los factores de virulencia de SePEC en aislamientos fecales de terneros con diarrea (Van Bost *et al.*, 2001b; Girardeu *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2010).

b) Factores de virulencia y genes codificantes

La mayoría de las cepas ExPEC son oportunistas (Ron, 2006) y presentan una gran diversidad de factores de virulencia que les permiten colonizar las mucosas, evadir los mecanismos de defensa (sistema del complemento y fagocitos), obtener nutrientes esenciales (hierro), invadir o causar daño en el hospedador y estimular una respuesta inflamatoria nociva. Los factores de virulencia característicos de las cepas ExPEC humanas incluyen adhesinas (fimbrias P y S), sideróforos (aerobactina), cubiertas de polisacárido (cápsulas y antígenos O específicos), proteasas, invasinas, toxinas (hemolisina y CDT) y proteínas de resistencia al suero (Russo y Johnson, 2000; Johnson y Russo, 2002). Las cepas SePEC bovinas usualmente presentan las adhesinas Pap, F17, AfaE-VIII y CS31A (Girardeu *et al.*, 2003; Fairbrother y Gyles, 2010), las cuales les permiten adherirse y competir a nivel de las mucosas, favoreciendo la invasión e ingreso a la circulación sanguínea (Fairbrother y Gyles, 2010).

i) Sideróforos: aerobactina

El hierro es crítico para el metabolismo bacteriano, pero este elemento se encuentra unido a hemoproteínas y proteínas de transporte (transferrina o lactoferrina), limitando el crecimiento de la bacteria en los tejidos y fluidos del hospedador (Blanco *et al.*, 2002). No obstante, algunas cepas de *E. coli* han logrado adaptarse a la escasez de hierro y para ello desarrollaron un sistema de captación mediado por la aerobactina. Esta última es un sideróforo del tipo hidroxamato (Neilands, 1990) que se describió por primera vez en *Aerobacter aerogenes* (Martínez *et al.*, 1990). La aerobactina favorece la persistencia y multiplicación de *E. coli* en el suero (Montgomerie *et al.*, 1984), la sangre y otros sitios extraintestinales (Blanco *et al.*, 2002), debido a que es capaz de captar el hierro presente en la transferrina (metaloproteína) (Neilands, 1990).

Los sideróforos son compuestos quelantes con alta afinidad por el hierro y tienen bajo peso molecular (Blanco *et al.*, 2002). El sideróforo capta el hierro y se forma un complejo, el cual se une a un receptor proteico (74 kDa) ubicado en la membrana externa de la pared celular, para luego ser transportado al interior de la bacteria (Martínez *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 2002).

El *cluster* de genes implicado en la síntesis de la aerobactina suele ubicarse en plásmidos (ej. ColIV) (Bindereif *et al.*, 1985; Mokady *et al.*, 2005b), aunque también pueden localizarse en el cromosoma bacteriano (Martínez *et al.*, 1990; Neilands, 1990). Los genes ubicados en el plásmido ColIV (*iucABCD* e *iutA*) se agrupan formando un operón (8 kb, aprox.) y son necesarios para la síntesis (*iuc*) (*iron uptake chelate*) y transporte (*iut*) (*iron uptake transport*) de la aerobactina (De Lorenzo *et al.*, 1986; Neilands, 1990). El gen *iucD* codifica una enzima (53 kDa) que sintetiza la N⁶-hidroxilisina y este compuesto es fundamental para formar la estructura de la aerobactina (Neilands, 1990).

La aerobactina es importante para la diseminación sistémica de *E. coli* desde el intestino. Esto quedó demostrado en corderos gnotobióticos infectados por vía oral y en forma simultánea con dos cepas 31A (CS31A⁺) bovinas; una de ellas expresó un sistema funcional de la aerobactina (LN31A, *iutA*⁺) mientras que la otra cepa perdió dicha capacidad (322AN, *iutA*⁻). La cepa LN31A expresó el sistema de la aerobactina *in vivo*, logró colonizar el intestino y alcanzó los linfonódulos mesentéricos para luego diseminarse hacia otros órganos (hígado, bazo y riñón) y fluidos corporales (sangre y líquido cefalorraquídeo, entre otros). En cambio, la cepa mutada 322AN sólo alcanzó los linfonódulos mesentéricos y en un número significativamente menor. Estos resultados indican que la aerobactina tiene un rol en la diseminación sistémica de la cepa LN31A desde el intestino (Der Vartanian *et al.*, 1992).

La presencia de aerobactina se ha investigado, mediante hibridación con sondas y bioensayo, en aislamientos de *E. coli* asociados a infecciones extraintestinales (principalmente septicemia y mastitis) en bovinos, ovinos, aves y porcinos, así como también en aislamientos obtenidos de heces normales. La detección de aerobactina fue mayor en las cepas asociadas a septicemia en bovinos (85% de las cepas) y aves (89%) con respecto a los aislamientos obtenidos de heces normales (4% y 11%, respect.) ($p < 0,05$). Además, el 61% de las cepas productoras de aerobactina hibridaron con la sonda específica para ColIV (Linggood *et al.*, 1987). En terneros con bacteriemia y septicemia, el 54-80% de los aislamientos de *E. coli* resultaron positivos a los marcadores genéticos del sistema aerobactina (*iucD* o *iutA*) (Fecteau *et al.*, 2001; Girardeu *et al.*, 2003; Ghanbarpour y Nazem, 2010; Marchese *et al.*, 2012). En un trabajo se analizó la relación entre la presencia de aerobactina y la virulencia de las cepas de *E. coli*. Para ello utilizaron aislamientos de orina, líquido ascítico (peritonitis) y sangre (bacteriemia por ITU) de pacientes enfermos o hisopados rectales de personas sanas. La patogenicidad de las cepas se evaluó en un modelo de ratón. La frecuencia de aislamientos productores de aerobactina fue del 75% (sangre) ($p = 0,004$), 47% (líquido ascítico), 38% (orina) y 42% (hisopado rectal). Las proporciones de

ratones muertos (35,4%) y las infecciones renales (4,5 log de bacterias/g) fueron mayores en los ratones inoculados con cepas productoras de aerobactina con respecto a los grupos desafiados con cepas negativas a la misma (11,4% y 2,9 log/g, respectivamente) (Montgomerie *et al.*, 1984).

ii) Fimbrias y adhesinas afimbriales

Antígeno CS31A

El Ag 31A forma parte de una fibrilla (2 nm de diámetro) cuya organización semeja a una cápsula y por ello recibió el nombre de CS31A (coli-surface-associated antigen) (Girardeu *et al.*, 1988). Sin embargo, algunos autores consideran que CS31A es una adhesina afimbrial (Le Bouguéneq y Bertin, 1999). Los genes codificantes para CS31A se ubican en un plásmido (100 MDa) que fue capaz de transferirse desde la cepa 31A (donante) hacia la cepa XA (receptora). La cepa transconjugante (XA31A) logró expresar un péptido de 29-kDa (subunidad fimbrial) que reaccionó por *Western blot* con un Ac anti-fimbria; además esta fimbria se pudo observar por ME (Girardeu *et al.*, 1988).

Posteriormente, se identificó el gen codificante de la subunidad fimbrial de CS31A (*clpG*), el cual tiene un sólo ORF de 834 pb y codifica una proteína con 278 aa. Sin embargo, la proteína madura consta de 257 residuos de aa (26,7 kDa), ya que tiene un péptido señal de 21 residuos. La secuencia nucleotídica de la región que codifica el polipéptido maduro de CS31A tiene una similitud del 60% con respecto a la secuencia del gen estructural de K88 (F4) y se localiza en el extremo 3' del operón (Girardeu *et al.*, 1991). La composición antigénica de CS31A también es muy similar a la de K88 (F4) y se demostró una similitud del 66% en los 25 residuos de aa del extremo N terminal. Los Acs dirigidos hacia la forma desnaturalizada de CS31A reaccionaron con K88 luego del análisis por *Western blot* (Girardeu *et al.*, 1988).

La fimbria CS31A puede ser expresada por cepas SePEC y ETEC de bovinos (Girardeu *et al.*, 1988). Un estudio evaluó la presencia de CS31A en aislamientos ETEC y no-ETEC bovinos que procedían de distintos países (Canadá, Francia e India). El 20,5% de las cepas resultaron CS31A+, mientras que el 17,3 % expresaron CS31A y F165 en forma simultánea (Contrepolis *et al.*, 1989). En otro estudio se evaluaron cepas de *E. coli* CNF1+ (56 cepas), aisladas de CI y órganos de terneros con diarrea, así como también cepas CNF1(-) (51 cepas) obtenidas de CI de terneros con diarrea menores a 3 semanas de vida. El 71% de las cepas CNF1+ y el 43% de las cepas CNF1(-) resultaron positivas a CS31A por las técnicas de PCR y *dot blot* con Ac específicos. El 87% de las cepas CNF1+/CS31A+ presentaron el gen codificante para la toxina EAST1 (enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin I), mientras que el 72%

de las cepas CS31A+/CNF1(-) presentaron esta misma característica. En este trabajo se demostró una amplia asociación entre CS31A y EAST1 (Bertin *et al.*, 1998).

En nuestro país se han identificado cepas de *E. coli* positivas al Ag CS31A. Estas cepas se detectaron en el 17% (13/73) de los terneros con diarrea y en el 29,6% (8/27) de los terneros con septicemia; esta diferencia no fue significativa ($p = 0,2$). Además, algunas cepas CS31A+ también expresaron la fimbria F17c (14,3% de las cepas). En cambio, el 100% de las cepas CS31A+ produjeron aerobactina y el 95,2% presentaron resistencia a la actividad bactericida del suero. Por lo tanto, la mayoría de estas cepas mostraron propiedades septicémicas, ya que ninguna expresó otras adhesinas fimbriales (F5, F41 y F17a-A) y tampoco mostraron potencial toxigénico (STa y VT). Los aislamientos de *E. coli* CS31A+ se clasificaron en 10 serogrupos diferentes, de los cuales O7, O8, O17 y O21 fueron los más frecuentes (Mercado *et al.*, 2003).

Experimentalmente, las cepas de *E. coli* CS31A+ han demostrado ser patógenas. En un estudio se desafiaron terneros gnotobióticos y descalostrados por vía oral con la cepa 31A. Inicialmente, los animales manifestaron decaimiento y disnea (4-5 hpi), pero luego todos murieron (20-40 hpi); las heces contenían moco y ocasionalmente sangre. A la necropsia se observó neumonía y edema en los riñones y la vesícula biliar. Las muestras de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo resultaron positivas al cultivo bacteriológico. Otro grupo de terneros convencionales y calostrados fue desafiado por vía endovenosa con la cepa 31A dentro de las 17-34 h posparto. Todos los terneros se enfermaron, manifestando artritis y paresia del tren posterior, mientras que sólo algunos murieron (2/7). La necropsia e histología demostraron la presencia de nefritis, neumonía y edema en los riñones y la vesícula biliar. En las muestras de sangre se aisló *E. coli* durante varios días posteriores a la infección. En las necropsias realizadas (7-21 dpi) se confirmaron las infecciones por *E. coli*, las cuales se localizaron fundamentalmente en el líquido sinovial (Contrepolis *et al.*, 1986).

En condiciones naturales, una investigación estableció una relación entre un síndrome de ataxia y diarrea en terneros y el aislamiento de *E. coli* CS31A+ y Col V+ en las heces. El 82% (23/28) de los terneros presentó aislamientos CS31A+, los cuales constituyeron la microbiota predominante en 16 terneros. En otro año se evaluaron terneros enfermos ($n = 15$) y sanos ($n = 9$) en los mismos establecimientos y se observó una diferencia significativa en la detección de *E. coli* CS31A+ en los terneros enfermos con respecto a los sanos ($p < 0,05$) (Espinsasse *et al.*, 1991).

Fimbria Pap (fimbria P)

La fimbria Pap (*pyelonephritis-associated pilus*) también se conoce con el nombre de fimbria P (Fernández y Berenguer, 2000; Nagy *et al.*, 2005), aunque en esta tesis se utilizará la abreviatura Pap. Esta fimbria tiene la estructura de un filamento fino y flexible (8-10 nm de diámetro). Los Ac dirigidos contra la subunidad PapA (inmunomarcación con oro) permitieron demostrar por ME que la fimbria Pap se ubica en la superficie bacteriana (Bertin *et al.*, 2000). La fimbria está constituida por un bastón (7 nm de diámetro) y una fibrilla delgada en donde se ubica la adhesina. El operón *pap* agrupa 11 genes que codifican las subunidades estructurales del bastón (*papAH*) y la fibrilla (*papKEFG*), las proteínas que intervienen en el ensamblado de la fimbria (*papCDJ*) y dos proteínas reguladoras (*papIB*) (Fernández y Berenguer, 2000). El operón *pap* de la cepa bovina 31A/O6 (curada del plásmido p31A) se ubica en el cromosoma bacteriano (Bertin *et al.*, 2000). Asimismo, el 90% de las cepas de *E. coli* aisladas del tracto urinario de niños y adultos con pielonefritis aguda tienen el operón *pap* a nivel cromosomal (Fernández y Berenguer, 2000). El operón *pap* se suele asociar a otros GV en islas de patogenicidad, principalmente en las cepas uropatogénicas (Nagy *et al.*, 2005).

La subunidad principal del bastón se denomina PapA (17,5 kDa) (Bertin *et al.*, 2000), mientras que PapE es el componente principal de la fibrilla del extremo de la fimbria (Fernández y Berenguer, 2000). Por otra parte, PapH es un componente menor que participa del anclaje de la fimbria a la membrana celular y probablemente también funcione como señal para frenar la biogénesis del bastón. Las subunidades menores PapK y PapF sirven como adaptadores para unir el bastón con la fibrilla y esta última con la adhesina, respectivamente. Las proteínas PapC y PapD son esenciales en la biogénesis de la fimbria, pero no son componentes estructurales de la misma. La proteína PapD funciona como una chaperona que participa en el plegado y ensamblado de las subunidades fimbriales (pilina) dentro del periplasma; además PapD presenta las subunidades fimbriales a PapC. Esta última es una proteína acomodadora de la membrana externa y se ubica en el sitio de ensamblado de la fimbria. PapC permite el desprendimiento del complejo PapD-pilina, para luego secretar y ensamblar las subunidades de pilina que van a formar la fimbria (Fernández y Berenguer, 2000; Nagy *et al.*, 2005).

La adhesina (PapG) se ubica en el extremo de la fimbria y se une a un receptor con α -D-galactopyranosil-(1-4)- β -D-galactopiranososa (Nagy *et al.*, 2005), los cuales están presentes en los glicolípidos de las células epiteliales del tracto urinario, riñón y otros tejidos (Fernández y Berenguer, 2000); existen al menos tres alelos para la adhesina PapG (PapGI, PapGII y PapGIII) (Nagy *et al.*, 2005) y en las cepas bovinas se han identificado las variantes II y III (Bertin *et al.*,

2000; Girardeu *et al.*, 2003). En un estudio se observó que una cepa positiva sólo a Pap (31A/O6 20K-) no fue capaz de adherirse *in vitro* a las vellosidades intestinales de ternero y cordero. Además, tampoco aglutinó eritrocitos de ternero, oveja, conejo, caballo y rata (Bertin *et al.*, 2000). Sin embargo, la fimbria Pap de las cepas ExPEC humanas se considera como un factor de colonización intestinal (Johnson y Russo, 2002) y esta fimbria suele aglutinar eritrocitos humanos (Lindberg *et al.*, 1984). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la fimbria Pap protege a *E. coli* frente a la actividad bactericida de los neutrófilos de roedores. La fimbria Pap inhibe la interacción entre la bacteria y los neutrófilos, además de reducir el estallido respiratorio en estos últimos. La disminución del estallido respiratorio se atribuyó a la adhesina PapG, la cual tiene propiedades electrostáticas (carga negativa) que determinan una menor interacción con los neutrófilos (Tewari *et al.*, 1994).

Diferentes estudios evaluaron la presencia de los genes del operón *pap* en aislamientos bovinos. El 61% de las cepas de *E. coli* CS31A+, aisladas del CI de terneros con diarrea y/o septicemia, presentaron *papC*. Este porcentaje aumentó al 72% cuando las cepas presentaron la combinación CS31A+/F17+. Sin embargo, la frecuencia de detección de *papC* se redujo (21%) cuando las cepas fueron negativas a CS31A, ya sea en presencia (22%, cepas F17+) o en ausencia (20%, cepas F17-) de F17. Mediante condiciones de cultivo específicas (medio Davis con glucosa y Casaminoácidos) y por *Western blot* se confirmó que el 89% de las cepas bovinas positivas al operón *pap* lograron expresar la fimbria Pap; este hallazgo sugiere que el operón *pap* está completo. Sin embargo, la adhesina papG sólo se pudo identificar en el 20% de las cepas bovinas analizadas y la misma correspondió a la clase II; resultó interesante que la adhesina papGII estuvo presente en las cepas CS31A+/F17+ (Bertin *et al.*, 2000).

En otro estudio se evaluaron 107 cepas bovinas aisladas de CI o sitios extraintestinales de terneros con signos o lesiones características de septicemia o enteritis. La mayoría de las cepas CNF1+ (93%) hibridaron con las sondas utilizadas para detectar el operón *pap* (*papA*, *papE*, *papG*), mientras que sólo el 22% de las cepas no-NTEC (CNF-) resultaron positivas. En ninguna de estas cepas se detectaron plásmidos. El 49% de las cepas CNF1+/Pap+ también presentaron la adhesina afimbrial Afa (Mainil *et al.*, 1997). En Canadá, una investigación evaluó 98 cepas (F165+) aisladas fundamentalmente de CI y órganos de terneros con diarrea y septicemia, respectivamente. El 90% resultaron positivas a la detección de *papC*, ya sea sólo (52,5%) o asociado al operón *afa* (Afa) (40%) (Harel *et al.*, 1991).

Fimbria F17

Las fimbrias F17 conforman una familia (Le Boug nec y Bertin, 1999) y se encuentran ampliamente distribuidas entre las cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea y septicemia (Van Bost *et al.*, 2001b; Girardeu *et al.*, 2003; Valat *et al.*, 2014). Además, se han identificado en cepas VTEC (Osek *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2011; Vilte *et al.*, 2012), ETEC (Contrepolis *et al.*, 1998) y NTEC (Oswald *et al.*, 1991; Mainil *et al.*, 1999; Orden *et al.*, 1999).

Estas fimbrias son filamentos finos y flexibles (3-4 nm de diámetro) que se ubican en la superficie de la bacteria (Bertin *et al.*, 1996a; Le Boug nec y Bertin, 1999). Su estructura consiste de un heteropolímero formado por varias copias de una subunidad estructural (F17-A, 20 kDa) y por un número menor de copias de la subunidad de adhesión (F17-G, 36 kDa) (Le Boug nec y Bertin, 1999; Gyles y Fairbrother, 2010). Las fimbrias de la familia F17 tienen variantes serológicas o subtipos (F17a, F17b, F17c y F17d) (Le Boug nec y Bertin, 1999; Nagy y Fekete, 2005) que difieren en la composición de aa de la subunidad estructural F17-A (identidad del 72-85%) (Le Boug nec y Bertin, 1999). Sin embargo, recientemente, se caracterizaron dos variantes nuevas de F17-A (F17e y F17f) y una variante nueva de F17-G (F17-G3) (Bihannic *et al.*, 2014). El cluster de genes necesario para la síntesis de F17 consta de sólo cuatro genes (5 kb) y se designan *f17A*, *f17D*, *f17C* y *f17G*. Estos genes codifican la subunidad estructural, la chaperona periplásmica, un acomodador de la membrana externa y la adhesina, respectivamente (Le Boug nec y Bertin, 1999). El operón que codifica la fimbria F17a se ubica en el cromosoma bacteriano, mientras que los genes codificantes para F17b se ubican en un plásmido (ej. pVir) (Le Boug nec y Bertin, 1999). Recientemente, se demostró que los genes codificantes para F17-G3 y F17e-A se ubican dentro de una isla de patogenicidad cromosomal. La secuencia nucleotídica del producto de PCR de F17e-A compartió un 73-93% de identidad con las secuencias de F17-A correspondientes a las otras variantes (Bihannic *et al.*, 2014).

Las fimbrias F17 median la adhesión entre la bacteria y los receptores celulares que contienen N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) (Le Boug nec y Bertin, 1999; Nagy y Fekete, 2005), los cuales están presentes en eritrocitos y células intestinales de bovino, entre otras (Nagy y Fekete, 2005). El reconocimiento del receptor celular es mediado por la proteína F17-G, la cual se exporta a la superficie de la bacteria y se localiza en la estructura de la fimbria F17 (Le Boug nec y Bertin, 1999). La mutación (o inactivación) del gen *f17G* genera bacterias con fimbrias intactas que no pueden adherirse a la vellosidad intestinal (fimbria no funcional), mientras que las cepas mutadas en el gen *f17A* pierden ambas propiedades (expresar la fimbria y adherirse). La reintroducción del gen *f17G* a la cepa mutante vuelve a conferir la capacidad de

adhesión a la mucosa intestinal. Por lo tanto la adhesión mediada por F17 requiere de una estructura intacta de la fimbria y su molécula de adhesión (F17-G) (Lintermans *et al.*, 1991).

Las variantes F17-G1 y F17-G2 tienen diferentes especificidades de receptor. La adhesina F17-G1 de las cepas productoras de F17a se une a receptores específicos de los enterocitos, pero no a receptores de las células Caco-2 humanas (Le Bougénéec y Bertin, 1999), mientras que la adhesina F17-G2 de las cepas productoras de F17c (cepa 31A/06) reconoce los receptores de células Caco-2 y de células intestinales de ternero y cordero, pero no así de las células intestinales de cerdo. La adición de GlcNAc, mucina e IgG purificada (anti-F17c) logró inhibir la adhesión de la cepa a los enterocitos (Bertin *et al.*, 1996a). Se especula que las adhesinas F17 mediarían primero la unión a la cubierta mucosa y luego en una segunda etapa facilitarían la unión a la superficie de la vellosidad intestinal (Le Bougénéec y Bertin, 1999). En presencia de manosa, la capacidad hemoaglutinante de las fimbrias F17 varía en función de los subtipos (Bertin *et al.*, 1996a; Le Bougénéec y Bertin, 1999).

Un estudio demostró que el 100% de las cepas SePEC bovinas y CS31A+ presentaron la combinación *f17Ac* y *f17G2*. Esta misma combinación también se identificó en la cepa de referencia 31A. En cambio, las cepas SePEC bovinas y F17+ (CS31A-) presentaron, principalmente, la variante *f17Aa* (87% de las cepas), mientras que *f17Ad* se detectó con menor frecuencia (11% de las cepas). En cuanto a la variante de la adhesina, la mayoría de estas cepas (95%) también presentaron *f17G2* (Bertin *et al.*, 1996b). Teniendo en cuenta el país de origen de las cepas y la presentación clínica asociada, un estudio determinó que las cepas de *E. coli* F17c (+) representan el 28% (46/166) de los aislamientos de terneros con diarrea (Bélgica), el 52% (246/473) de los aislamientos de terneros con diarrea y ataxia (Francia) y el 50% (21/42) de las cepas de terneros con septicemia (Francia). El 85-100% de las cepas F17c presentaron simultáneamente CS31A (Bertin *et al.*, 1996a). Por otra parte, un estudio determinó que los aislamientos ETEC y no-ETEC de terneros con diarrea suelen tener la variante F17a (Contrepolis *et al.*, 1998), aunque sólo el 9% de las cepas F5⁺ (K99) poseen simultáneamente la fimbria F17 (Le Bougénéec y Bertin, 1999).

Una investigación analizó las variantes genéticas de *f17A* y *f17G* en cepas NTEC-1, NTEC-2 y no-NTEC, y a su vez se intentó establecer una relación con el origen de las mismas. El 100% de las cepas NTEC-1 de porcinos y bovinos presentaron la variante *f17Ac* (Mainil *et al.*, 2000). En cambio, en las cepas NTEC-2 no predominó ninguna variante de *f17A*. En el 31% de las cepas NTEC-2 se detectó *f17Ab*, mientras que las variantes *f17Ac* y *f17Ad* se identificaron en el 25% y 7,8% de las cepas, respectivamente. En 7 aislamientos se detectaron dos variantes de

F17-A en forma simultánea (3 cepas *f17Ab/f17Ac* y 4 cepas *f17Ac/f17Ad*). Sin embargo, en el 49% de las cepas NTEC-2 no se pudo tipificar la variante del gen *f17A*. La variante *f17Ac* tuvo una localización cromosomal en todas las cepas NTEC-1 evaluadas, mientras que en el 33% de las cepas NTEC-2 se ubicó en plásmidos. En cambio, la variante *f17Ab* se ubicó en plásmidos en la mayoría de las cepas NTEC-2 (93%). En cuanto a las cepas NTEC-2 que presentaron las dos variantes de *f17A* en forma simultánea, los genes se ubicaron en plásmidos. La adhesina *f17G2* predominó en las cepas NTEC-1 y NTEC-2, así como también en las cepas no-NTEC (Mainil *et al.*, 2000).

Adhesina afimbrial (Afa)

Las adhesinas de la familia Afa (*afimbrial adhesin*) fueron las primeras adhesinas no asociadas a fimbrias que se descubrieron. Su identificación se realizó por primera vez en una cepa uropatogénica (KS52) asociada a pielonefritis (Le Bouguéneq y Bertin, 1999; Nagy *et al.*, 2005). Las adhesinas Afa son expresadas por cepas de *E. coli* asociadas a infecciones extraintestinales (ITU y septicemia, entre otras) y diarrea en humanos y diferentes especies de animales, incluidas las aves (Le Bouguéneq y Bertin, 1999; Mainil, 2013).

La adhesina afimbrial Afa está codificada por un *cluster* de 6 genes (*afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD*, *afaE* y *afaF*) y existen diferentes variantes o *clusters* genéticos (ej. Afa-I, Afa-III, Afa-VII, Afa-VIII) (García *et al.*, 1994; Le Bouguéneq y Bertin, 1999); en la actualidad se reconocen al menos ocho variantes (Nagy *et al.*, 2005). Todos los *clusters* presentan un segmento altamente conservado (4,1 kb) en donde se ubican los genes *afaB*, *afaC* y *afaD* (Le Bouguéneq y Bertin, 1999). Estos *clusters* genéticos tienen una localización plasmídica o dentro del cromosoma bacteriano y ello depende de cada variante (Le Bouguéneq y Bertin, 1999; Mainil, 2013). Más específicamente, el plásmido Vir puede presentar determinantes de *afa-8* (Afa-VIII) junto con las secuencias codificantes para CNF2. El *cluster* de genes *afa* es único entre las bacterias, ya que simultáneamente codifica proteínas involucradas en la adhesión e invasión a las células epiteliales (Le Bouguéneq y Bertin, 1999). La estructura de las adhesinas afimbriales puede compararse con una fimbria truncada (sin subunidades principales), ya que sólo cuenta con las subunidades menores en la base y una subunidad de adhesión (Mainil, 2013). La biogénesis de Afa requiere de proteínas especializadas que cumplen con las funciones de chaperona periplásmica (AfaB), proteína de anclaje a la membrana externa (AfaC) y reguladores transcripcionales (AfaA y AfaF) (Le Bouguéneq y Bertin, 1999).

El gen *afaE* codifica la subunidad de adhesión (AfaE) que es responsable de la unión específica a las células uroepiteliales, Hep-2 y HeLa, manteniendo un patrón denominado de

adherencia difusa (Le Bouguéneec y Bertin, 1999; Lalioui *et al.*, 1999; Mainil, 2013). En el caso particular de las cepas productoras de la adhesina AfaE-VIII, las mismas se adhieren a las líneas celulares MDCK y UROtsa (Laliloui *et al.*, 1999), pero no a las células HeLa, Caco-2 y MDBK (Laliloui *et al.*, 1999; Mainil, 2013). La secuencia del gen *afaE* es muy heterogénea entre los diferentes *clusters* genéticos de Afa, dando lugar a la producción de adhesinas que son antigénicamente distintas (Le Bouguéneec y Bertin, 1999). La variante Afa-VIII de las cepas patógenas de origen animal no reconoce al DAF (factor acelerador del decaimiento) como receptor celular. La proteína AfaD se expone en la superficie de la bacteria junto a la proteína AfaE y cumple una función de invasina, es decir que favorece la internalización de la bacteria dentro de las células HeLa (Le Bouguéneec y Bertin, 1999). Experimentalmente se demostró que la proteína AfaD-VIII confiere invasividad en células HeLa a aquellas cepas que tienen mutado el gen *afaD* dentro del *cluster* Afa-III (*afa-3*). La adhesión a este tipo celular se mantuvo porque la cepa mutada tenía intacto el gen de la adhesina AfaE-III (*afaE3*) (Lalioui *et al.*, 1999).

Existen protocolos de PCR que se han desarrollado para detectar el gen codificante de la adhesina AfaE-VIII (*afaE8*), el cual pertenece al *cluster* genético Afa-VIII (*afa-8*). Un estudio con cepas bovinas ($n = 250$) de Europa y Canadá encontró que la frecuencia de detección de *afa-8* era mayor en las cepas NTEC-1 (20%), NTEC-2 (26%) y no-NTEC (11%) aisladas de terneros con septicemia y diarrea con respecto a la cepas NTEC-2 (2%) y no-NTEC (0%) aisladas de terneros sin enfermedad (Gérardin *et al.*, 2000).

c) Patogenia

El desarrollo de la septicemia por *E. coli* se atribuye a dos factores determinantes: i) la ocurrencia de una FTP total o parcial de Igs calostrales y ii) la exposición del ternero frente a una cepa de *E. coli* con capacidad para invadir y multiplicarse en la sangre, produciendo bacteriemia y finalmente septicemia (Besser y Gay, 1995). La enfermedad se presenta de forma esporádica, aunque ocurren brotes cuando coexiste una alta prevalencia de FTP de inmunidad calostrales y una elevada exposición frente a cepas patógenas. Para el desarrollo de la septicemia es necesario que la bacteria invada al hospedador en la puerta de entrada, sobreviva a los mecanismos de defensa (inmunidad) y se disemine por el organismo causando un daño. Los atributos de virulencia necesarios para cumplir estos pasos incluyen la adhesión, la resistencia a la actividad bactericida del suero, la producción de aerobactina y la síntesis de toxinas (Fecteau *et al.*, 2009).

Los terneros recién nacidos carecen de la microbiota intestinal del bovino adulto. Por lo tanto, si nacen en un ambiente muy contaminado, es probable que las cepas patógenas colonicen el intestino antes de que se establezcan las bacterias comensales (Fecteau *et al.*, 2009).

Las rutas potenciales de invasión para *E. coli* incluyen la cavidad nasal y orofaringe (Besser y Gay, 1995), el ombligo y la mucosa intestinal (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009). *E. coli* puede ser pinocitada por los enterocitos durante el período de absorción de macromoléculas (Igs) dentro de las primeras 2-6 h de vida (Corley *et al.*, 1977; Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009). Por otro lado, en los terneros de mayor edad, la pérdida de integridad en el epitelio intestinal (enteritis de distintos orígenes) favorece el ingreso de bacterias a la circulación sanguínea (Fecteau *et al.*, 2009). En terneros descalostrados y desafiados por vía oral, la bacteria se aísla de linfonódulos retrofaríngeos y mesentéricos a las 2-4 hpi. Luego se produce bacteriemia (6-8 hpi) y finalmente progresa hacia una septicemia. Cuando la cepa implicada es virulenta, el tiempo transcurrido entre la invasión y los signos clínicos es de aproximadamente 24 h (Besser y Gay, 1995). Sin embargo, la septicemia por *E. coli* tiene diferentes presentaciones.

La forma sobreaguda o aguda (Besser y Gay, 1995) afecta a terneros menores a 7 días de vida (Fecteau *et al.*, 2009) y tiene un curso clínico corto (6-8 h) (Besser y Gay, 1995). Los signos clínicos incluyen letargia, depresión, disminución del reflejo de succión, tendencia al decúbito (esternal o lateral) (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009), taquicardia, taquipnea, inyección de vasos esclerales (Fecteau *et al.*, 2009), falta de respuesta a los estímulos y finalmente la muerte (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009). La fiebre no es un signo común durante esta forma de presentación (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009) e incluso puede haber hipotermia (Fecteau *et al.*, 2009). En algunos casos se desarrolla diarrea (Besser y Gay, 1995; Van Metre *et al.*, 2008; Fecteau *et al.*, 2009; Uzal *et al.*, 2016), fundamentalmente en los estadios terminales de la enfermedad (últimas 3-4 h) (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009), y en ese momento es posible aislar a las cepas invasoras a partir de las heces (Besser y Gay, 1995).

La presentación subaguda (Fecteau *et al.*, 2009) o crónica (Besser y Gay, 1995) se observa en terneros de 7-28 días de vida (Fecteau *et al.*, 2009). La misma ocurre cuando la bacteriemia se retrasa (Besser y Gay, 1995) como consecuencia de una FTP de Igs calostrales de tipo parcial (5-10 mg IgG1/ml de suero del ternero) o cuando los terneros se exponen a una cepa de menor virulencia (Gay y Besser, 1994; Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009). En esta presentación de la enfermedad se desarrollan infecciones localizadas en las articulaciones (poliartritis), las meninges (meningitis) (Besser y Gay, 1995), los ojos (hipopión y uveítis), el pulmón (neumonía) (Fecteau *et al.*, 2009) y el ombligo (onfaloflebitis); los terneros afectados suelen desarrollar fiebre. La meningitis se manifiesta con letargia, disminución del reflejo de succión, opistótono y luego evoluciona hacia un estado de depresión profunda (coma) o se

presentan convulsiones tónico-clónicas y reflejos espinales exagerados, que finalmente culminan con la muerte (Fecteau *et al.*, 2009).

Las cepas septicémicas de *E. coli* se excretan a través de las secreciones oral y nasal o por la orina (Gay y Besser, 1994; Besser y Gay, 1995). Si bien la excreción fecal es importante, la misma se presenta en las fases terminales de la enfermedad. La transmisión se produce por contacto directo entre terneros y en forma indirecta a través de la contaminación del alimento o los utensilios con secreciones de animales enfermos (Besser y Gay, 1995). Los serogrupos asociados con mayor frecuencia a septicemia colibacilar en terneros incluyen O15, O26, O45, O78, O86, O115, O117, O137 y O153 (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009).

d) Lesiones

Los terneros muertos de forma aguda tienen pocas alteraciones macroscópicas. Las mismas se limitan a una congestión leve (coloración rojo-azulada) de los pulmones y a la consistencia firme del bazo. A nivel microscópico se observa un engrosamiento de los septos alveolares (mononucleares y neutrófilos) y efusión de exudado (fibrina y neutrófilos) dentro de los alvéolos. En el bazo se observa una corona de neutrófilos alrededor de la pulpa blanca y también se puede evidenciar un número anormal de neutrófilos en la circulación de diferentes órganos (pulmón e hígado). Los trombos de fibrina pueden ser evidentes en los capilares pulmonares, glomérulos y sinusoides hepáticos. Algunos terneros desarrollan una nefritis intersticial aguda y multifocal con presencia de neutrófilos. En los casos agudos y más severos se observan hemorragias en serosas y líquido serosanguinolento en el saco pericárdico (Besser y Gay, 1995; Brown *et al.*, 2007; Uzal *et al.*, 2016). Los pulmones adquieren una tonalidad rojo-azulada profunda, la consistencia es gomosa, fallan en colapsar (Brown *et al.*, 2007; Uzal *et al.*, 2016) y los septos interalveolares están separados por edema. Los vasos meníngeos pueden estar congestivos y las meninges húmedas. Las lesiones histológicas son similares a las descritas anteriormente, pero hay congestión severa, trombosis y edema en los pulmones y otros órganos (Brown *et al.*, 2007; Uzal *et al.*, 2016).

En la forma subaguda o crónica se producen infecciones localizadas en las superficies serosas, articulaciones y meninges. Comúnmente se observan peritonitis, pleuritis y pericarditis fibrinosa, artritis fibrinopurulenta, meningitis e hipopión (Brown *et al.*, 2007; Uzal *et al.*, 2016). El fluido articular aumenta de volumen, se torna más turbio y contiene cordones o placas de fibrina (Besser y Gay, 1995). Todas estas lesiones se presentan individualmente o en diferentes combinaciones (Brown *et al.*, 2007; Uzal *et al.*, 2016). El examen microscópico permite evidenciar las mismas lesiones que en la forma aguda, aunque la congestión y el edema de las

superficies serosas son más extensivos y están asociados a un exudado inflamatorio y fibrinoso (Brown *et al.*, 2007; Uzal *et al.*, 2016).

e) Diagnóstico

En el animal vivo se realiza por cultivo bacteriológico y aislamiento de *E. coli* a partir de muestras de sangre y fluidos corporales (líquido sinovial, cefalorraquídeo, peritoneal y pleural) (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009). El diagnóstico en el animal sacrificado se confirma a partir del cultivo y aislamiento de *E. coli* en más de un órgano parenquimatoso u otro sitio interno (serosas y fluidos corporales), exceptuando los linfonódulos mesentéricos. Los órganos comúnmente recomendados para el cultivo incluyen pulmón, bazo, hígado y riñón (Besser y Gay, 1995; Uzal *et al.*, 2016). Además, es relevante la observación de lesiones macroscópicas y/o microscópicas que sean compatibles con la enfermedad (Uzal *et al.*, 2016). Los análisis hematológicos y bioquímicos son un complemento para el diagnóstico (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009). La identificación de GV en los aislamientos SePEC se realiza por PCR o hibridación *in situ* con sondas de ADN (Fecteau *et al.*, 2001; Ghanbarpour y Oswald, 2009; Marchese *et al.*, 2012).

5.6.5 *E. coli* necrotoxigénica (NTEC)

a) Definición

En el año 1983 se descubre una toxina en aislamientos de *E. coli* asociados a diarrea aguda en niños (menores de 2 años). Dicha toxina produjo necrosis en la piel de conejo y causó alteraciones morfológicas en los cultivos celulares (HeLa, Vero y CHO). Debido a estas características, los autores la denominaron factor necrotizante citotóxico (CNF) (*cytotoxic necrotizing factor*) (Caprioli *et al.*, 1983). El término NTEC (*necrotoxigenic E. coli*) se utiliza para designar a las cepas de *E. coli* capaces de elaborar CNF (Nagy *et al.*, 2005). Por lo tanto, las cepas productoras de CNF1 se denominan NTEC-1, mientras que aquellas productoras de CNF2 se designan NTEC-2 (De Rycke *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2005).

b) Factores de virulencia y genes codificantes

Diferentes estudios describen la obtención de aislamientos NTEC a partir de terneros con enteritis, diarrea (Blanco *et al.*, 1988; De Rycke *et al.*, 1990; Pohl *et al.*, 1993; Burns *et al.*, 1996) y septicemia (Mainil *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001b) o de bovinos adultos y terneros sin diarrea (Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998).

i) Toxinas CNF

La toxina CNF es una proteína (115 kDa) (Blanco y Blanco, 1993) que produce necrosis en la piel de conejo (Blanco *et al.*, 1988; De Rycke *et al.*, 1990), tiene efecto letal en ratones luego de la inoculación por vía intraperitoneal y causa multinucleación en las células HeLa (De Rycke *et al.*, 1990) o en otras líneas celulares (Vero, CHO, MA-104 y Hep-2) (Blanco y Blanco, 1993). Las toxinas CNF activan a las proteínas Rho, una pequeña familia de GTPasas cuya función es regular el citoesqueleto. Por lo tanto, estas toxinas producen una modificación del citoesqueleto celular que conduce a la formación de haces grandes de filamentos de actina (fibras de estrés). Además, la toxina CNF facilita que las células puedan ingerir partículas de látex y bacterias al entrar en contacto con la membrana. La activación de las proteínas Rho también acelera la síntesis de ADN y estimula el ingreso en la fase S del ciclo celular (De Rycke *et al.*, 1999).

En un estudio se evaluaron las propiedades tóxicas de los extractos celulares de *E. coli* aisladas de animales y humanos. En el mismo De Rycke y cols propusieron los nombres de CNF1 y CNF2 para identificar a las toxinas (De Rycke *et al.*, 1990). Comparando la actividad de ambas, CNF2 produjo una mayor necrosis en la piel de conejo (100 veces más potente), tuvo una mayor actividad letal en ratones inoculados (100%) y fue la única toxina que causó necrosis en la planta del pie de ratones (De Rycke *et al.*, 1990). En cambio, CNF1 fue más potente para inducir la multinucleación en células HeLa (De Rycke *et al.*, 1999). La toxina CNF1 causa multinucleación, agrandamiento (10 veces el tamaño) y redondeamiento de las células HeLa, mientras que la toxina CNF2 causa multinucleación de menor magnitud, elongación, polimorfismo y pérdida parcial de la viabilidad celular (De Rycke *et al.*, 1990; Blanco y Blanco, 1993). Los ensayos de neutralización con antisueros específicos para cada toxina indican que existe cierto grado de neutralización cruzada entre ambas (De Rycke *et al.*, 1990).

La toxina CNF1 está codificada por un gen cromosómico, mientras que el gen codificante para CNF2 se ubica en plásmidos (ej. pVir) (De Rycke *et al.*, 1999). Los análisis de las secuencias deducidas de aa para ambas toxinas (1014 aa) indican un 84% de similitud (De Rycke *et al.*, 1999). Los aislamientos NTEC de terneros se caracterizan por producir CNF2 (Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1999, Van Bost *et al.*, 2001b), independientemente de la condición clínica del animal (Burns *et al.*, 1996). Las cepas NTEC-2 se pueden recuperar a partir de las heces (Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.* 1998; Orden *et al.*, 1999) o de sitios extraintestinales (Burns *et al.*, 1996; Mainil *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001b). La frecuencia

relativa de NTEC-1 en la MF de terneros diarreicos y sanos o en sus órganos es mucho menor (Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1999).

ii) Fimbrias y otras toxinas asociadas a CNF

Las cepas NTEC causantes de septicemia e ITU en humanos muestran una asociación evidente entre CNF1, α -hemolisina (Hly) y fimbria P (Pap), la cual también se confirmó a nivel molecular. Un análisis detallado demostró que los genes *cnf1*, *hly* y *prs* (adhesinas de la fimbria P) se ubican en una isla de patogenicidad (PAI-5) (110 kb) cromosomal (De Rycke *et al.*, 1999). Estas características también se confirmaron en las cepas NTEC-1 bovinas aisladas de casos de diarrea y septicemia. El 96% de las mismas fueron hemolíticas y la asociación entre Hly y Pap se observó en el 69% de las cepas (Mainil *et al.*, 1999).

El plásmido Vir de los aislamientos NTEC-2 presenta genes codificantes para CNF2, F17b y Afa. Las cepas NTEC-2 positivas a F17 tienen la capacidad de adherirse de manera específica a la vellosidad intestinal del ternero y el 53% de las cepas productoras de CNF2 presentan F17 (Oswald *et al.*, 1991). Con respecto a las variantes de F17, el 56% de las cepas NTEC-2 tienen F17b, mientras que F17c y F17d se identificaron con menor frecuencia (22% cada una) (De Rycke *et al.*, 1999). El plásmido Vir también expresa CDT-III, un miembro de las toxinas de distensión citoletal (CDT, *citolethal distending toxin*) (Nagy *et al.*, 2005). Estas toxinas producen un bloqueo irreversible del ciclo celular en la etapa G2/M, el cual se atribuye al mantenimiento de una forma inactiva del factor promotor de la mitosis (MPF) (De Rycke *et al.*, 1999). Además, las cepas NTEC-2 de origen fecal o asociadas a infecciones extraintestinales se caracterizan por producir aerobactina (5% y 70%), resistir a la actividad bactericida del suero (50% y 79%) o expresar ambas propiedades en forma conjunta (41% y 50%), aunque sólo raramente causan hemólisis en agar sangre (De Rycke *et al.*, 1990; Oswald *et al.*, 1991).

En Bélgica, una investigación caracterizó las cepas NTEC aisladas de terneros con septicemia o diarrea. Las cepas NTEC-2 asociadas a septicemia (26 cepas) resultaron positivas a CDT (100%), F17 (69%) y Afa-VIII (69%), mientras que sólo muy pocas cepas fueron positivas a Pap (7%). En cambio, todas las cepas NTEC-1 septicémicas (4 cepas) resultaron positivas a la combinación Pap/Sfa. Con respecto a las cepas NTEC (sin especificar variantes) aisladas de casos de diarrea (35 cepas), las mismas presentaron genes codificantes para CDT (57%), Afa-VIII (62%), Pap (43%) y F17 (31%) (Van Bost *et al.*, 2001b). En otro trabajo se analizaron cepas NTEC de 6 países (Bélgica, Canadá, Francia, Irlanda, Italia y España), las cuales se aislaron de terneros con septicemia y diarrea. El 65% de las cepas NTEC-2 fueron positivas para F17 y/o Afa; los genotipos de estas cepas incluyeron F17 (38%), Afa (14%) y F17/Afa (13%). Por otra

parte, las cepas NTEC-1 presentaron genotipos muy distintos a los de las cepas NTEC-2, ya que el 80% presentó Pap y/o Sfa (Mainil *et al.*, 1999).

c) Prevalencia de NTEC

En España se evaluó la frecuencia de NTEC en terneros y bovinos adultos (Blanco *et al.*, 1988; Blanco *et al.*, 1998). La detección de las toxinas se realizó por cultivo en líneas celulares (HeLa y Vero) (Blanco *et al.*, 1988; Blanco *et al.*, 1998) y el resultado (efecto citopático) se confirmó mediante las pruebas de necrosis en la piel de conejo y letalidad en ratones (Blanco *et al.*, 1988) o por PCR (Blanco *et al.*, 1998). La prevalencia de NTEC fue del 18% (14/78) en terneros menores a 30 días de vida y con diarrea, los cuales procedían de 13 granjas ubicadas en La Coruña (Blanco *et al.*, 1988). Posteriormente, un estudio realizado en Galicia determinó una prevalencia del 58% (53/90) para NTEC-2 en terneros sin diarrea y menores a 4 meses de vida; sólo 1 ternero resultó positivo a NTEC-1. La frecuencia de aislamientos NTEC en vacas fue mucho menor (18%; 47/268) con respecto a los terneros ($p < 0,001$) y la mayoría de estos animales (17%) eran portadores de NTEC-2. En dicho trabajo se concluyó que las cepas NTEC-2 colonizan el intestino del ganado bovino y tienen una amplia distribución en los rodeos bovinos, ya que pueden encontrarse en el 95% de las granjas (Blanco *et al.*, 1998).

En otro estudio llevado a cabo en Irlanda se evaluó la presencia de NTEC en bovinos. La detección de CNF se realizó por cultivo celular (HeLa) y seroneutralización (Burns *et al.*, 1996). La frecuencia de NTEC-2 fue mayor en los terneros sin diarrea (31%; 35/113) con respecto a los diarreicos (19,3%; 43/223). La detección de NTEC-1 fue mucho menor y similar en ambos grupos de terneros (4,4% y 4%, respectivamente). La mayor proporción de bovinos infectados con cepas NTEC-2 se observó, principalmente, en los terneros menores a 4 semanas de vida y sin diarrea (57,1%) (Burns *et al.*, 1996).

En general, los serogrupos de NTEC son muy diversos. En una colección de cepas NTEC-2 (57 cepas), aportada por diferentes investigadores de 7 países, se estableció que los serogrupos más frecuentes fueron O2 (26,3%), O8, O75, O78 y O141 (7% cada uno). En cuanto a las cepas NTEC-1 (45 cepas), las mismas se clasificaron dentro de los serogrupos O2 (37,5%), O8 (12,5%), O11, O15, O78 y O83 (8,3% cada uno) (Mainil *et al.*, 1999).

d) Patogenia

En un experimento se inocularon por vía oral terneros recién nacidos y parcialmente calostrados con las cepas B20a (CNF2+, F17c y F17d, aerobactina) y 1404 (CNF2+, F17b aerobactina). La diarrea se presentó a las 24 y 31 hpi (rango 11-40 hpi) y tuvo una duración

de 18 h (rango 5-53 h), aunque muchos terneros continuaban con diarrea al momento de la eutanasia (9/14 terneros). La mayoría de los animales inoculados a las 6 h de vida manifestaron decaimiento, falta de apetito, deshidratación (7/11), signos respiratorios (2/11) y se encontraron moribundos (3/11) al momento de la eutanasia. La excreción fecal de las cepas NTEC-2 coincidió con el inicio de la diarrea (o la antecedió por 4 h) y persistió por 19,5 h (rango 4-46 h), hasta el momento de la eutanasia. El número de cepas NTEC-2 durante el pico de excreción fecal fue variable ($10^{8,6} - 10^{11,8}$ UFC/ml) y su recuento no mostró una relación con la severidad de la enfermedad. Estas cepas también se recuperaron en un elevado número ($10^6 - 10^9$ UFC/ml) a partir de las distintas porciones de intestino. En cuanto a los sitios extraintestinales, las cepas NTEC-2 se aislaron de sangre (6/14 terneros), pulmón (6/14) e hígado (6/14); algunos terneros (5/8) presentaron aislamientos simultáneos en 2 o 3 sitios. Este trabajo confirmó que las cepas NTEC-2 fueron capaces de colonizar la mucosa intestinal y causar diarrea en terneros. Además, estos animales manifestaron signos de infección bacteriana generalizada y la obtención de aislamientos a partir de sangre y órganos internos demostró su carácter invasivo (Van Bost *et al.*, 2001a).

En otro trabajo similar se infectaron terneros (6 h de vida) parcialmente calostrados con distintas cepas NTEC-2, las cuales fueron modificadas genéticamente para evaluar la importancia de los diferentes factores de virulencia. En la cepa 1404 se hicieron mutaciones alélicas de los genes *cnf2* (1404 Δ CNF2) y *cdt-III* (1404 Δ CDT-III), mientras que la cepa H209 (pVir) se generó por conjugación del plásmido Vir entre la cepa 1404 y una cepa receptora no patógena de humano (H209). Los ternos desafiados con las cepas H209 (pVir) y 1404 Δ CDT-III desarrollaron diarrea (20-32 hpi) y la misma persistió hasta la eutanasia (44 y 91 hpi). El comienzo de la excreción de las cepas precedió en 8-12 h (grupo 1404 Δ CDT-III) o coincidió (grupo H209 (pVir)) con el inicio de la diarrea. En cambio, sólo un ternero (1/4) inoculado con la cepa 1404 Δ CNF2 manifestó diarrea (36 hpi), pero este animal presentó una infección natural por RV. Los recuentos de las cepas fueron similares, tanto en el intestino delgado (de $10^{6,6} - 10^9$ UFC/ml) como en el intestino grueso (de $10^{8,2} - 10^9$ UFC/ml). Además, las 3 cepas se pudieron aislar de pulmón e hígado. Esta investigación demostró que los factores de virulencia presentes en el plásmido Vir confieren propiedades patógenas a *E. coli*. La toxina CNF2 tendría un rol como causa de diarrea, pero no participó en el desarrollo de la bacteriemia. La pérdida de *cnf2* en la cepa 1404 Δ CNF2 se asoció a una reducción en su patogenicidad, ya que los terneros no desarrollaron diarrea, pero mantuvo su capacidad para invadir diferentes órganos internos (Van Bost *et al.*, 2003).

e) Lesiones

En los terneros infectados experimentalmente con cepas NTEC-2 se observó congestión y engrosamiento de la mucosa intestinal, principalmente a nivel de yeyuno e íleon. Además, se apreció un aumento en el tamaño (hipertrofia) de los linfonódulos mesentéricos (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003). Las lesiones histológicas más relevantes incluyeron atrofia de vellosidades y presencia de un importante infiltrado (neutrófilos, linfocitos y plasmocitos) en la mucosa del intestino delgado. Las criptas intestinales presentaron necrosis y los vasos linfáticos de la mucosa estaban distendidos (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003). En los linfonódulos mesentéricos se observó una activación de los nódulos linfoides y la presencia de neutrófilos desde los sinusoides corticales hasta la médula (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003). En la mucosa del ciego y colon se observó un infiltrado compuesto por linfocitos y neutrófilos; a nivel de las criptas hubo necrosis en algunos terneros (Van Bost *et al.*, 2001a). En el pulmón se detectaron neutrófilos y linfocitos a nivel del intersticio o en el lumen alveolar y bronquiolar, acompañado de congestión y edema interalveolar (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003). El bazo de algunos terneros presentó activación de la población de linfocitos, los cuales se encontraban entrelazados con neutrófilos. En el hígado se observaron infiltrados de células inflamatorias (linfocitos y neutrófilos) y hemorragias, aunque no en todos los terneros (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003).

f) Diagnóstico de NTEC

Si bien CNF1 y CNF2 ejercen efecto citopático en distintas líneas celulares, es conveniente utilizar la línea HeLa para detectar las toxinas y posteriormente confirmar el resultado por seroneutralización (De Rycke *et al.*, 1990). También se puede emplear la prueba intradérmica en conejos, la cual ha demostrado tener una mayor sensibilidad que la prueba de letalidad en ratones (Blanco *et al.*, 1988). Posteriormente, se desarrolló una técnica de PCR con oligonucleótidos específicos. Esta última no sólo establece el genotipo de la toxina (*cnf1* y *cnf2*) sino que también muestra una excelente correspondencia con el ensayo *in vitro* en células HeLa. Esta PCR tuvo un 100% de sensibilidad y especificidad para identificar y caracterizar correctamente a 107 cepas NTEC-1 (CNF1⁺) y 133 cepas NTEC-2 (CNF2⁺) (Blanco *et al.*, 1996).

CAPÍTULO 2

“Circulación y caracterización molecular de rotavirus bovino en establecimientos de la provincia de Buenos Aires”



Vet. Enrique L. Louge Uriarte

1. Objetivos e hipótesis

1.1 Objetivo general

- Evaluar la circulación y diversidad genética de RVA en terneros nacidos en establecimientos de la provincia de Buenos Aires.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar y comparar la frecuencia de infecciones por RVA y CoVB en terneros diarreicos y sin diarrea, procedentes de tambos y campos de cría para carne ubicados en zonas productivas de la provincia de Buenos Aires.
- Caracterizar las combinaciones de los genotipos G y P de RVA en muestras de materia fecal de terneros en ambos sistemas de producción.
- Evaluar la variación temporal en los genotipos G y P de RVA a partir de heces obtenidas en un tambo con elevada mortalidad asociada a DNT.
- Establecer las relaciones filogenéticas de los genes codificantes para VP7 y VP8* entre las cepas de RVA obtenidas en el presente estudio y aquellas cepas que infectan bovinos, diferentes especies de animales y humanos en otras partes del mundo.
- Evaluar la patogenicidad de cepas bovinas de RVA, correspondientes a los genotipos G6(III)P[11] y G10P[11], en un modelo de ternero descalostrado.

1.3 Hipótesis de trabajo

- Existen diferencias en la circulación de RVA y CoVB en terneros de tambo y de cría para carne procedentes de establecimientos ganaderos de la provincia de Buenos Aires.
- Las combinaciones de los genotipos G y P de RVA, así como la diversidad genética de las cepas, varían de acuerdo al sistema de producción bovina.
- La ubicación geográfica de los establecimientos y el sistema de producción determinan relaciones filogenéticas de los genes codificantes para VP7 y VP8* entre las cepas de RVA.

2. Materiales y métodos

2.1 Establecimientos productores de leche y carne

Se seleccionaron un total de 32 establecimientos ganaderos (tambos, $n = 18$; campos de cría, $n = 14$) en los cuales se recolectaron muestras de MF de terneros durante el período 2008-2010. El muestreo fue no-probabilístico (Thrusfield, 2005), según la demanda o colaboración por parte de los veterinarios responsables de la sanidad de cada establecimiento. Todos los establecimientos presentaron casos de DNT al momento de la visita y cada muestreo incluyó al menos un 20% de terneros con diarrea. Según la información obtenida, se pudo determinar que el 50% de los tambos y el 78% de los campos de cría aplicaban vacunas a las hembras gestantes para prevenir la DNT.

Los tambos evaluados se ubicaron en las cuencas lecheras Mar y Sierras ($n = 15$), Oeste ($n = 2$) y Abasto Norte ($n = 1$). La distribución de los tambos abarcó 11 partidos de la provincia de Buenos Aires que incluyeron Balcarce ($n = 2$), Carmen de Areco ($n = 1$), Gral. Pueyrredón ($n = 3$), Lincoln ($n = 1$), Lobería ($n = 2$), Mar Chiquita ($n = 2$), Olavarría ($n = 3$), Pehuajó ($n = 1$), Rivadavia ($n = 1$), Tandil ($n = 1$) y Tres Arroyos ($n = 1$).

Los establecimientos de cría para carne se situaron en la Cuenca del Salado ($n = 8$) y en la Depresión de Laprida ($n = 6$), dos de las principales zonas de cría de la provincia de Buenos Aires (Carrillo, 2001). La distribución de los campos de cría incluyó a 8 partidos de la provincia, entre ellos Azul ($n = 1$), González Chávez ($n = 2$), Gral. Pueyrredón ($n = 1$), Gral. Paz ($n = 1$), Mar Chiquita ($n = 3$), Olavarría ($n = 3$), Pila ($n = 2$) y Rauch ($n = 1$).

2.2 Terneros y muestras de materia fecal

Durante el estudio se evaluaron un total de 422 terneros y en cada establecimiento se incluyeron animales diarreicos y sin diarrea, independientemente del sistema de producción. El tamaño de muestra promedio fue de 13 terneros, con rangos de 3-23 en tambo y de 3-28 en cría para carne.

En los tambos se recolectaron 240 muestras de MF de terneros diarreicos ($n = 137$) y sin diarrea ($n = 103$), representando el 57% y el 43% de las muestras, respectivamente. Los terneros fueron en su mayoría de la raza Holando Argentino, aunque dos tambos criaban animales de la raza Jersey o de la cruce Jersey x Holando Argentino. En aquellos tambos con información disponible, se determinó que la edad promedio de los terneros muestreados fue de 15 días (rango

2-69). El sistema de crianza individual con estaca fue el más frecuente (80% de los tambos) y la alimentación incluyó leche (60%), sustituto lácteo (26,7%) o ambos (13,3%).

En los campos de cría para carne se recolectaron 182 muestras de MF de terneros diarreicos ($n = 104$) y sin diarrea ($n = 78$), constituyendo el 57% y el 43% de las muestras, respectivamente. Las razas de los terneros incluyeron Aberdeen Angus, Hereford y sus cruza. Todos los animales tenían menos de 60 días vida al momento del muestro y en cuanto al manejo se mantuvieron junto a sus madres en pasturas, pastizales naturales o rastrojos de cultivos.

Las muestras de MF se recolectaron desde el recto y se colocaron en recipientes plásticos, estériles y con cierre hermético, manteniéndose refrigeradas hasta su llegada al laboratorio (dentro de las 48 h). Según la información obtenida, un total de 100 terneros (36 de tambo y 64 de cría) habían recibido terapia con antibióticos para el tratamiento de la DNT.

2.3 Estudio longitudinal de RVA y CoVB en un establecimiento lechero

El tambo denominado “DR”, ubicado en la cuenca Oeste (provincia de Buenos Aires), tenía antecedentes de DNT con un elevado índice de mortalidad (15-20%) asociado a la misma. Inicialmente, el tambo fue muestreado en el año 2009 (apartado 2.1). No obstante, debido a la historia del establecimiento, se decidió realizar muestreos adicionales y puntuales durante los brotes de DNT ocurridos en 2010 ($n = 12$) y 2011 ($n = 4$). El sistema de crianza era individual con estaca y la alimentación consistía en 2 L de leche por toma (2 veces/día), 1 kg de alimento balanceado y agua *ad libitum*. El calostrado se realizaba en forma manual (2-3 L) durante las primeras horas de vida y las madres recibían 3 dosis de vacuna para prevenir la DNT. La vacuna comercial estaba formulada con 2 cepas de RVA bovino (genotipos G6P[5] y G10P[11]) y se aplicaba al momento del secado, al ingresar al parto y a los 7 días posparto.

2.4 Detección de RVA en materia fecal

Las muestras de MF se diluyeron 1/4 en PBS-Tween 0,05% (PBS-T; Sigma, St. Louis, USA) (Apéndice 2), se homogeneizaron y luego se clarificaron por centrifugación (6000 rpm) durante 5 min. (± 1 min.). El sobrenadante se utilizó para la detección de Ag de RVA por ELISA indirecto de captura policlonal (Cornaglia *et al.*, 1989; Parreño *et al.*, 2004). A continuación se detallan los pasos de la técnica de ELISA.

Los pocillos de las columnas impares de cada placa (Maxisorp, Nunc) fueron sensibilizados con una dilución (v/v; 1/5000,1/7000,1/10000 según titulación) de suero de cobayo sin inmunizar (captura negativa) en *buffer* carbonato-bicarbonato (pH 9,6; Apéndice 2).

Los pocillos de las columnas pares fueron sensibilizadas con suero de cobayo hiperinmunizado con la cepa Indiana (G6P[5]) (captura positiva) y diluido en *buffer* carbonato-bicarbonato (pH 9,6) (v/v; 1/5000, 1/7000, 1/10000 según titulación). La placa se incubó toda la noche (4-8 °C) y luego se hicieron 2 lavados con PBS-T 0,05%. Posteriormente, las diluciones de MF se cargaron en dos pocillos de la captura negativa y en dos pocillos de la captura positiva. En todos los ensayos se incluyeron controles de MF positiva y negativa a RVA por ELISA, así como también suspensiones virales de las cepas de referencia Indiana (G6P[5]) y NCDV Cody-I801 (G8P[1]). Para blanco de reactivos se utilizó la solución de lavado (PBS-T 0,05%) y se colocó en los pocillos de ambas capturas. Posteriormente, se hicieron 4 lavados y se adicionó una dilución (v/v; 1:2000, 1/7000 según titulación) en PBS-T 0,05% de suero policlonal de bovino hiperinmunizado con la cepa Indiana (G6P[5]). La placa se incubó (1-1:30 h) en estufa a 37 °C y se realizaron 4 lavados. Luego, se adicionó Ac conjugado con peroxidasa (anti-IgG bovina desarrollado en cabra; Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) y se incubó (1-1:30 h) en estufa a 37 °C, seguido de 5 lavados. El revelado se hizo con una solución de ABTS [sal diamónica de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolina-6-ácido sulfónico)] (Sigma-Aldrich and Co, St. Louis, USA), H₂O₂ (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) y *buffer* de citrato (pH 5) (Apéndice 2). La reacción se mantuvo hasta obtener una señal fuerte en el control positivo (color verde, absorbancia 0,500). La lectura se hizo una longitud de onda (λ) de 405 nm (Multiskan, Labsystems Inc).

El ensayo fue aceptado cuando: a) los valores de DO (densidad óptica) de los controles positivos (MF y suspensión viral) en la captura positiva fueron mayores al punto de corte del ensayo (promedio del blanco de reactivos + 3 DE), b) la DO corregida de los controles positivos fue mayor a 0,200 unidades de absorbancia y c) la DO del blanco de reactivos se mantuvo dentro del rango de absorbancia (0,50 - 0,200). Una muestra fue considerada positiva cuando su DO en la captura positiva fue mayor al punto de corte del ensayo y su DO corregida fue mayor a 0,200 unidades. Una muestra fue considerada negativa cuando su DO corregida fue menor a 0,200 unidades y su DO en la captura positiva fue menor al punto de corte del ensayo.

Los reactivos del ELISA fueron gentilmente cedidos por la Dra. Viviana Parreño (Laboratorio de Virus Entéricos del Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar, Argentina).

2.5 Detección de CoVB en materia fecal

Las diluciones de las muestras de MF se prepararon como se detalló previamente (apartado 2.4). La identificación de CoVB se realizó por ELISA indirecto de captura con AcMs (Smith *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2006).

Brevemente, los pocillos de columnas impares de cada placa (Maxisorp, Nunc) fueron sensibilizados con una dilución (v/v; 1/10000) de líquido ascítico de ratón inmunizado con células de mieloma sin fusionar (captura negativa) en *buffer* carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Los pocillos de las columnas pares fueron sensibilizados con un pool de 4 AcMs diluidos (v/v; 1/10000 cada AcM) en *buffer* carbonato-bicarbonato (pH 9,6) (captura positiva). Los AcMs utilizados fueron específicos para epitopes de las proteínas HE (BC 21 F63C y BC 22 F83C), S (BC 29 G72C) y N (BC 28 H1.2C) de la cepa CD DB2 de CoVB. La sensibilización de la placa (4-8 °C) se hizo durante una noche y luego se realizaron 2 lavados (PBS-T 0,05%). Posteriormente, la placa se bloqueó con leche descremada en PBS-T (p/v; 10%) (Apéndice 2) y se incubó (1-1:30 h) en estufa a 37 °C. Las diluciones de MF se agregaron en los pocillos de las capturas negativa y positiva. En cada placa se incluyeron diluciones de MF positiva y negativa a CoVB por ELISA, así como también suspensiones virales de la cepa de referencia Mebus. Como blanco de reactivos se utilizó la solución de lavado, la cual se adicionó en los pocillos de ambas capturas. Posteriormente, se realizaron 4 lavados y se agregó una dilución (v/v; 1/4000) en PBS-T 0,05% de suero policlonal de cobayo hiperinmunizado con la cepa Mebus. La placa se incubó (1-1:30 h) en estufa a 37 °C y se hicieron 4 lavados. Luego, se adicionó el Ac conjugado con peroxidasa (anti-IgG de cobayo desarrollado en cabra; KPL, Gaithersburg, USA) y se incubó (1-1:30 h) a 37 °C, seguido de 5 lavados. Para el revelado se utilizó una solución preparada con ABTS [sal diamónica de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolina-6-ácido sulfónico)] (Sigma-Aldrich and Co, St. Louis, USA), H₂O₂ (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) y *buffer* citrato (pH 5; Apéndice 2). La reacción se mantuvo hasta obtener una señal fuerte en el control positivo (color verde, absorbancia 0,500). La lectura se efectuó a una longitud de onda (λ) de 405 nm (Multiskan, Labsystems Inc).

Los criterios para la aceptación del ensayo y para clasificar a una muestra como positiva o negativa fueron los mismos que los utilizados en el ELISA de RVA (apartado 2.4). Los AcMs, el líquido ascítico de ratón y la cepa de referencia Mebus fueron gentilmente cedidos por la Dra. Linda Saif (Food Animal Health Research Program, Ohio State University, USA).

2.6 Genotipificación de RVA bovino

Las muestras de MF positivas a RVA por ELISA y con suficiente cantidad de material fueron seleccionadas para caracterizar los genotipos G y P.

2.6.1 Extracción ARN a partir de materia fecal

El ARN se extrajo utilizando TRIzol (Life Technologies Inc., Frederick, Maryland, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la MF se diluyó (v/v; 1/4) en agua destilada (tubos 1,5 mL) y se centrifugó (5000 rpm) para obtener el sobrenadante. Posteriormente, se mezclaron 200 µl de sobrenadante y 500 µl de TRIzol, seguido de una homogeneización e incubación a temperatura ambiente (TA) por 10 min; para las cepas de referencia se utilizaron 300 µl de sobrenadante del cultivo celular. Luego, se le agregó 100 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), se homogeneizó e incubó a TA durante 3 min. A continuación, se realizó una centrifugación (20.000 g por 15 min a 4 °C) para recuperar la fase acuosa superior. Esta última se mezcló con igual volumen de isopropanol (2-Propanol, Merck, Merck Química, BA, Argentina) y se homogeneizó e incubó a TA durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó (12.000 g por 15 min a 4 °C) y el sobrenadante se descartó.

El pellet se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de agua estéril libre de ARNasas y ADNasas (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina), conservándose a -20 °C hasta su utilización (Alfieri *et al.*, 2004).

2.6.2 Determinación del tipo G

La caracterización del genotipo G de RVA se realizó por la técnica de RT-PCR semi-anidada y múltiple (Garaicoechea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012). La misma consta de dos etapas sucesivas que incluyen una RT-PCR (1ra. ronda de amplificación) y una PCR semi-anidada y múltiple (2da. ronda de amplificación). La RT-PCR amplifica el gen que codifica la proteína VP7 y se utilizan los oligonucleótidos consenso Gra-5 y Gra-3 (Chang *et al.*, 1996; Tabla 1.2). En la PCR semi-anidada y múltiple se emplean Gra-5 y diferentes oligonucleótidos reversos y específicos para los genotipos G6 linaje III (G6(III)), G6 linaje IV (G6(IV)) (Badaracco *et al.*, 2012), G8 y G10 (Gouvea *et al.*, 1994b). Las secuencias de los oligonucleótidos, el sitio de apareamiento dentro del genoma y los tamaños de los productos de amplificación se detallan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Oligonucleótidos para la RT-PCR y PCR semi-anidada múltiple de VP7

Oligonucleótido	Genotipo	Secuencia (5'→3')	Posición	Tamaño (pb)	Referencia
Gra-5 (+)*	---	GGC TTT AAA AGC GAG AAT TT	1-20	1062	Chang <i>et al.</i> , 1996
Gra-3 (-)	---	GGT CAC ATC ATA CAA CTC TA	1062-1044		Chang <i>et al.</i> , 1996
N167 (-)	G6(IV)	TAT AAG CAG AAA GCT GTA A	167-148	167	Badaracco <i>et al.</i> , 2012
H167 (-)	G6(III)	AAC GAA TAA AAA TCT GTA A	167-148	167	Badaracco <i>et al.</i> , 2012
H499 (-)	G6(III)	TCC AAT TCC AAC GTT GAA A	499-480	499	Badaracco <i>et al.</i> , 2012
HT8 (-)	G8	CGG TTC CGG ATT AGA CAC	273-256	273	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
ET10 (-)	G10	TTC AGC CGT TGC GAC TTC	714-697	714	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b

* sentido

Los procedimientos y las condiciones de termociclado para la RT-PCR fueron los siguientes. Primero se realizó una desnaturalización (94 °C x 5 min) de una mezcla que contuvo 8 µl de ARNdc, 0,8 µl de DMSO y 0,6 µl de cada oligonucleótido consenso (Gra-5 y Gra-3; 10 µM) (Tabla 1.2). Luego, en cada tubo se agregaron 10 µl de la mezcla de RT (Tabla 2.2) y se sintetizó el ADNc (37 °C x 1 h), seguido de la inactivación de la enzima (70 °C x 15 min). La amplificación del gen codificante para VP7 se realizó con 2,5 µl de ADNc y 47,5 µl de la mezcla de PCR (Tabla 3.2) según el siguiente programa de ciclado: 94 °C x 3 min, 35 ciclos (94 °C x 1 min, 44 °C x 1 min, 72 °C x 2 min) y una extensión final de 72 °C x 7 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (*Px2*, Thermo Scientific).

Tabla 2.2. Mezcla de la RT para el gen de VP7

Componentes	Volumen (µl)
H ₂ O	1,75
Buffer RT 5X ^a (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM Cl ₂ Mg, pH 8.3)	4
dNTPs (5mM) ^b	2
DTT (ditiotreitól) ^a	2
M-MLV (200 U/µl) ^a	0,25
Total	10

^aTranscriptasa reversa; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

^bDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

Tabla 3.2. Mezcla de la PCR para el gen de VP7

Componentes	Volumen (µl)
H ₂ O	34,5
Buffer 5X ^b (7,5 mM Cl ₂ Mg, pH8,5)	5
Cl ₂ Mg (25mM)	1
dNTPs (5mM) ^c	2
DMSO	2
Gra-5 (10 µM)	1
Gra-3 (10 µM)	1
Taq polimerasa (500U; 5U/ µl) ^b	1
Total	47,5

^bPromega, Madison, WI, USA.

^cDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

Para realizar la PCR semi-anidada y múltiple del genotipo G (2da. ronda), se tomó 0,5 µl (sin diluir) o 1 µl de una dilución (v/v; 1/10) del producto de RT-PCR (1ra. ronda) y se transfirió a 50 µl de la mezcla de PCR (Tabla 4.2); en aquellas muestras negativas a la 1ra. ronda, se tomaron 5 µl de la mezcla de RT-PCR. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 94 °C x 2 min, 30 ciclos (94 °C x 30s, 42 °C x 30s y 72 °C x 45s) y una extensión final de 72 °C x 7 min.

Tabla 4.2. Mezcla de la PCR semi-anidada y múltiple para determinar el tipo G

Componentes	Volumen (µl)
H ₂ O	28,5
Buffer 5X ^b (7,5 mM Cl ₂ Mg, pH8,5)	10
Cl ₂ Mg (25mM)	1
dNTPs (5mM) ^c	4
H499 (20 µM)	2
H167 (20 µM)	1
N167 (20 µM)	1
HT8 (20 µM)	1
ET10 (20 µM)	1
Gra-5 (10 µM)	1
Taq polimerasa (500U; 5U/ µl) ^b	0,5
Total	50

^bPromega, Madison, WI, USA.

^cDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

2.6.3 Determinación del tipo P

La determinación del genotipo P de RVA se realizó mediante la técnica de RT-PCR semi-anidada y múltiple (Gouvea *et al.*, 1994a; Garaicoechea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012). La misma consta de dos etapas sucesivas que incluyen una RT-PCR (1ra. ronda) y una PCR semi-anidada y múltiple (2da. ronda). La RT-PCR amplifica la subunidad VP8* del gen codificante para VP4 (1ra. ronda) y se emplean los oligonucleótidos consenso Con3 y Con2 (Gouvea *et al.*, 1994a; Tabla 5.2). Posteriormente, se continúa con la PCR semi-anidada y múltiple, en la cual se utilizan Con2 y diferentes oligonucleótidos hacia adelante y específicos para los genotipos P[1], P[5] y P[11] (Gouvea *et al.*, 1994a; Garaicoechea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012). Las secuencias de los oligonucleótidos, el sitio de apareamiento dentro del genoma y los tamaños de los productos de amplificación de VP8* se detallan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Oligonucleótidos para la RT-PCR y PCR semi-anidada y múltiple de VP8*

Oligonucleótido	Genotipo	Secuencia (5'→3')	Posición	Tamaño (pb)	Referencias
Con3 (+)*	---	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32	877	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
Con2 (-)	---	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887-868		Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
P1 K (+)	P[1]	ACC AAC GAA CGC GGG GGT G	266-284	622	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b Garaicoechea <i>et al.</i> , 2006
P5 K (+)	P[5]	RCC AGG TGT CRC ATC AGA G	333-351	555	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b Garaicoechea <i>et al.</i> , 2006
pB223(+)	P[11]	GGA ACG TAT TCT AAT CCG GTG	574-594	314	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b Garaicoechea <i>et al.</i> , 2006

* sentido

Para realizar la RT-PCR de VP8* se mezclaron 10 µl del ARNdc, 0,8 µl de DMSO y 0,6 µl de cada oligonucleótido consenso (20 µM, Tabla 5.2). Posteriormente, se hizo una desnaturalización (95 °C x 5 min.) de la mezcla y en cada tubo se agregaron 8 µl de la mezcla de RT (Tabla 6.2) para la síntesis del ADNc (37 °C x 1 h), seguido de la inactivación de la enzima (95 °C x 5 min). A continuación, en el mismo tubo, se adicionaron 45 µl de la mezcla de PCR (Tabla 7.2) y las condiciones de ciclado fueron: 94 °C x 3 min, 35 ciclos (94 °C x 1 min, 47 °C x 1 min, 72 °C x 2 min) y una extensión final de 72 °C x 7 min. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (Px2, Thermo Scientific).

Tabla 6.2. Mezcla de la RT para el gen de VP8*

Componentes	Volumen (μl)
H ₂ O	1,75
Buffer RT 5X ^a (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM Cl ₂ Mg, pH 8,3)	4
dNTPs (5mM) ^b	2
MML-V (transcriptasa reversa) ^a 50U	0,25
Total	8

^aTranscriptasa reversa; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

^bDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

Tabla 7.2. Mezcla de la PCR para el gen de VP8*

Componentes	Volumen (μl)
H ₂ O	27,5
Buffer 5X ^b (7,5 mM Cl ₂ Mg, pH 8,5)	13
dNTPs (5mM) ^c	2
Con 2 (20 μM)	1
Con 3 (20 μM)	1
Taq polimerasa (500U; 5U/ μl) ^b	0,5
Total	45

^bPromega, Madison, WI, USA.

^cDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

Para la PCR semi-anidada y múltiple del genotipo P (2da. ronda) se tomó 0,5 μl (sin diluir) o 1 μl de una dilución (v/v; 1/10) del producto de RT-PCR (1ra. ronda) y se agregó a los 45 μl de la mezcla de PCR (Tabla 8.2); para las muestras negativas en la 1ra. ronda se tomaron 5 μl de la mezcla de RT-PCR. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 94 °C x 2 min, 35 ciclos (94 °C x 30 seg, 47 °C x 1 min y 72 °C x 45 seg) y una extensión final de 72 °C x 7 min.

Tabla 8.2. Mezcla de la PCR semi-anidada y múltiple para determinar el tipo P

Mezcla PCR semiandida y múltiple	Volumen (µl)
H ₂ O	31
Buffer 5X ^b (7,5 mM Cl ₂ Mg, pH 8,5)	5
Cl ₂ Mg (25mM)	2
dNTPs (5mM) ^c	4
Con 2 (20 µM)	1
P1K/P5K/pB223 (20 µM, cada uno)	1
Taq polimerasa (500U; 5U/ µl) ^b	1
Total	45

^bPromega, Madison, WI, USA.

^cDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

2.6.4 Electroforesis y revelado de los productos de PCR

Los productos de amplificación se visualizaron con una lámpara UV luego de la corrida electroforética en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (BrEt) o con colorante SYBR *Safe* (Life Technologies Corporation, USA). Para ello se preparó una solución de agarosa al 1,6 % (p/v) (Biodynamics SRL, Argentina) en *buffer* TAE 1X (*Apéndice 2*), la cual se calentó hasta disolverla completamente y posteriormente se le agregó BrEt (10 mg/ml) a una concentración final de 0,5 µg/ml o colorante SYBR *Safe* según las recomendaciones de uso (1µl de colorante cada 10 ml de *buffer* TAE1X con agarosa al 1,6%). Los geles se corrieron a 90 V durante 1 h y 15 min en cubas electroforéticas (Labnet Inc, USA) conectadas a una fuente de poder (Consort EV 265, Belgium).

2.7 Cepas de referencia de RVA

Las cepas utilizadas para el ELISA y la genotipificación incluyeron RVA/Cow-tc/USA/Indiana/XXXX/G6P[5] (G6(IV)), RVA/Cow-tc/USA/B223/XXXX/G10P[11], RVA/Cow-tc/USA/NCDV Cody I-801/XXXX/G8P[1] y una cepa de campo G6(III)P[11] (Badaracco *et al.*, 2012). Las cepas Indiana, B223 y NCDV Cody I-801 fueron gentilmente cedidas por la Dra. L. Saif (Food Animal Health Research Program, The Ohio State University, USA) y la cepa de campo G6(III)P[11] por la Dra. V. Parreño.

2.8 Estudio filogenético de las secuencias nucleotídicas de VP7 y VP8*

2.8.1 Purificación y secuenciación de los productos RT-PCR

Para evaluar la diversidad de los genes que codifican VP7 y VP8*, se seleccionaron los productos de RT-PCR correspondientes a cepas obtenidas de terneros diarreicos de tambo ($n = 12$) y de cría para carne ($n = 11$). Para su selección se tuvo en cuenta el genotipo G/P, el sistema de producción y la ubicación geográfica del establecimiento (Tabla 9.2).

Tabla 9.2. Selección de cepas de RVA obtenidas a partir de terneros diarreicos en diferentes regiones productivas de la provincia de Buenos Aires

Cepa	G/P tipo	Tipo producción	Partido	Año	Región productiva
CLM_D_BA	G10P[11]	Tambo	Balcarce	2008	Cuenca Mar y Sierras
27412VA_D_BA	G6(III)P[11]	Tambo	Tandil	2008	Cuenca Mar y Sierras
6590LSyLM_D_BA	G6(III)P[11]	Tambo	Lincoln	2008	Cuenca Oeste
16SC_D_BA	G10P[11]	Tambo	Gral. Pueyrredón	2008	Cuenca Mar y Sierras
9DM_D_BA	G6(III)P[11]	Tambo	Balcarce	2009	Cuenca Mar y Sierras
21DA_D_BA	G6(III)P[11]	Tambo	Olavarría	2009	Cuenca Mar y Sierras
7765LE_D_BA	G6(III)P[11]	Tambo	Pehuajó	2009	Cuenca Oeste
4894DR_D_BA	G6(III)P[11]	Tambo	Gral. Rivadavia	2009	Cuenca Oeste
4385VT_D_BA	G8 P[11]	Tambo	Mar Chiquita	2009	Cuenca Mar y Sierras
5595DR_D_BA	G6(IV)P[5]	Tambo	Gral. Rivadavia	2010	Cuenca Oeste
10155TSIL_D_BA	G6(IV)P[5]	Tambo	Carmen de Areco	2010	Cuenca Abasto Norte
3DR_D_BA	G10P[11]	Tambo	Gral. Rivadavia	2011	Cuenca Oeste
6LB_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	Mar Chiquita	2008	Cuenca del Salado
12LB_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	Mar Chiquita	2008	Cuenca del Salado
3SJR_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	Gral. Pueyrredón	2008	Cuenca del Salado
1CR_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	Mar Chiquita	2008	Cuenca del Salado
10ED_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	Pila	2008	Cuenca del Salado
5LA_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	Olavarría	2008	Depresión de Laprida
10DD_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	Azul	2008	Depresión de Laprida
7LM_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	Olavarría	2009	Depresión de Laprida
8EB_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	González Chaves	2009	Depresión de Laprida
15G_B_BA	G6(IV)P[5]	Cría para carne	González Chaves	2009	Depresión de Laprida
11LC_BA_BA	G6(IV)+10P[11]	Cría para carne	Olavarría	2010	Depresión de Laprida

Los productos de RT-PCR fueron purificados con los kits comerciales *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) e *Illustra ExoProStar* (GE Healthcare, Amersham Place, UK), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La secuenciación se realizó en ambos sentidos y para ello se utilizaron los oligonucleótidos consenso de VP7 (Gra-5 y Gra-3) y VP8* (Con3 y Con2) (Tablas 1.2 y 5.2). En el caso particular de la cepa 4385VT_D_BA (G8P[11]), la secuenciación del gen de VP7 se llevó a cabo con el oligonucleótido Beg9 (5'-GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G-3'). Para la secuenciación parcial del gen de VP4 se

emplearon los oligonucleótidos GEN_VP4_P11_103F (5'-AAT GTG ACT GTG CAG CTT GG-3'), VP4_876_895F (5'-GGA CTA GGT TAT AAA TGG TC-3') y GEN_VP4_P11_2352R (5'-GGT CAC ATC CTC ATA CAA ACA GC-3'). La secuenciación fue realizada por los servicios de MacroGen Inc. (Korea) y de la Unidad de Genómica Básica (Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar, Argentina).

2.8.2 Edición de las secuencias génicas y análisis filogenético

Los estudios filogenéticos se realizaron con las secuencias nucleotídicas que codifican VP7 (981 nt, posiciones 49–1029) y VP8* (877 nt, posiciones 11–887). En el caso particular de la cepa 4385VT_D_BA (G8P[11]), se utilizaron las secuencias nucleotídicas casi completas, tanto de VP7 (935 nt, nt 49–984) como de VP4 (2141 nt, posiciones 154–2295). Para el análisis filogenético se incluyeron las cepas obtenidas en el presente estudio y otras cepas de diferentes especies animales y humanos que se encuentran disponibles en la base de datos GenBank (NCBI, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Las secuencias fueron editadas y ensambladas con los programas Chromas (versión 2.33, Technelisyum Pty Ltd.) y BioEdit 7.1.3.0 (Hall *et al.*, 1999). Posteriormente, se realizaron los alineamientos de las secuencias (nt y aa) mediante el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) y se mantuvieron los parámetros preestablecidos por defecto.

Los resultados de la genotipificación (por RT-PCR semiendiado y múltiple) correspondiente a las 23 cepas seleccionadas (Tabla 9.2) fueron comparados con aquellos obtenidos luego del análisis de las secuencias nucleotídicas de VP7 y VP8*. Para ello se utilizó la herramienta bioinformática RotaC *online classification tool* (<http://rotac.regatools.be>) (Maes *et al.*, 2009) y se siguieron las recomendaciones del *Rotavirus Classification Working Group* (RCWG) (Matthijnssens *et al.*, 2008b).

Los análisis filogenéticos y la reconstrucción de los árboles se realizaron con el programa Mega versión 5 (Tamura *et al.*, 2012), utilizando el algoritmo de distancias de Neighbor-Joining (N-J) (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura-2 parámetros. La confiabilidad de los árboles reconstruidos fue evaluada mediante *bootstrap* con 1000 pseudoréplicas de las matrices. En los análisis filogenéticos de VP7 para los genotipos G6 y G10 se utilizaron los puntos corte previamente establecidos (Badaracco *et al.*, 2013b), los cuales permiten definir los linajes dentro de cada genotipo. Adicionalmente, para lograr una mejor caracterización de las cepas que circularon en los establecimientos (Tabla 9.2), se compararon las secuencias deducidas de aa para VP7 y VP8* con respecto a las cepas vacunales, haciendo especial énfasis en las regiones antigénicas de ambas proteínas.

2.8.3 Construcción de los gráficos de frecuencia de distancias

Para el análisis filogenético de VP7 correspondiente al genotipo G8 se definieron los linajes y se calculó el valor del punto de corte. Con respecto a los análisis filogenéticos de VP8*, se definieron los linajes de P[5] y P[11] utilizando un mayor número de cepas (75 y 87 cepas, respectivamente). Por lo tanto, y debido a la variabilidad genética de VP8*, se procedió a calcular los valores de los puntos de corte. Para dichos cálculos se utilizaron los valores de las distancias genéticas expresados en porcentajes, los cuales se obtuvieron con el algoritmo de distancias pareadas (*pairwise distances*) bajo el modelo de Kimura-2 parámetros (Mega 5) (Tamura *et al.*, 2012). Los gráficos de frecuencias para las distancias genéticas de a pares se construyeron colocando el porcentaje de las distancias en el eje de las abscisas (*x*) y su frecuencia en el eje de las ordenadas (*y*). Las distancias genéticas entre las cepas del mismo linaje se denominaron como distancias “intra linaje”, mientras que las distancias genéticas entre las cepas de diferentes linajes se designaron como distancias “entre linajes”. El punto de corte para diferenciar los linajes fue definido como aquel valor, expresado en porcentaje, que mejor discrimina las distancias intra linaje y entre linajes (Matthijnssens *et al.*, 2008a).

2.9 Análisis estadístico

Las proporciones de terneros infectados con RVA y CoVB fueron comparadas teniendo en cuenta el sistema de producción (tambo y cría para carne) y la condición clínica (diarrea y sin diarrea). Para ello se utilizó un análisis bivariado en tablas de contingencia (2 x 2). Se calcularon los *Odds Ratio* (OR) y los intervalos de confianza (IC 95%) como medidas para las asociaciones entre variables. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson. Las infecciones combinadas de RVA y CoVB fueron excluidas del análisis, ya que podrían condicionar la presentación clínica de las infecciones por RVA. El riesgo de infección por RVA fue considerado significativo ($p \leq 0,05$) si el IC 95% para el OR no incluyó el valor 1. Adicionalmente, se utilizó el análisis estadístico de Mantel-Haenszel para descartar un posible efecto de confusión entre las variables explicativas (condición clínica y sistema de producción). Las variables nominales con significancia estadística fueron incluidas dentro de un modelo de regresión logística binaria, el cual permite evaluar la participación de las dos variables (condición clínica y sistema productivo) en la variación de la respuesta (detección de RVA). El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS (IBM SPSS Statistics).

2.10 Modelo ternero para estudios de patogenicidad de RVA

2.10.1 Terneros

Se utilizaron terneros descalostrados ($n = 2$) de la raza Holando Argentino. El grado de transferencia pasiva de Ac calostrales fue evaluado indirectamente mediante la prueba del glutaraldehído. Para ello se recolectaron muestras de sangre a las 24 h de vida. El suero obtenido (0,5 ml) se mezcló con 1 gota de reactivo y se aguardó durante 40 min para evaluar la formación del coágulo. Ningún suero coaguló y ello indicó de manera indirecta que los niveles de Ac serían menores a 4,0 mg/ml (agammaglobulinemia). Los animales fueron alimentados 2 veces por día con 2 L de sustituto lácteo (Booster, Alimental ®) y diariamente se les administró enrofloxacin (5%) (Floxagen, Vetanco ®) utilizando una dosis de 1 ml/10 kg. El experimento con animales fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal, FCV, UNCPBA (Nro. Expediente Interno 026/12).

2.10.2 Inoculación

Como inóculo se utilizaron MF positivas a RVA, las cuales fueron obtenidas a partir de terneros de tambo con diarrea. Las cepas se caracterizaron como G6(III)P[11] y G10P[11] por RT-PCR semi-anidada y múltiple (2.6.2 y 2.6.3). Las MF se diluyeron (p/v; 1:10) en 20 ml de medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle's (MEM-E) (Gibco, cat. 41500-034) y se centrifugaron (2500 rpm x 5 min.). El sobrenadante sin filtrar se colocó en una jeringa estéril y la descarga del inóculo se realizó por vía oral estimulando el reflejo de succión. Los terneros fueron desafiados a los 4 y 5 días de vida con las cepas G6(III)P[11] y G10P[11], respectivamente.

2.10.3 Recolección de muestras, histopatología e inmunohistoquímica

Una vez ingresados los terneros a los boxes, diariamente se tomaron muestras de MF y se conservaron a -20°C . Los terneros fueron sacrificados a los 4 dpi, luego de manifestar diarrea. Durante la necropsia se recolectó el CI y se tomaron muestras de diferentes porciones de intestino (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) para evaluar las lesiones histológicas. Las muestras de órganos se fijaron en formol amortiguado al 10% y los cortes histológicos se tiñeron con la coloración de hematoxilina-eosina (HE) (Apéndice 2). La capacidad infectiva de las cepas de RVA se evaluó mediante la técnica IHQ en secciones histológicas de yeyuno e íleon. Brevemente, se hizo el desenmascaramiento antigénico en una olla a presión (Biocare Decloaking Chamber) y como Ac primario (desarrollado en cabra) se utilizó una IgG purificada y específica para RVA (cepa NCDV) (ViroStat; cat. 0501). El sistema de detección empleado incluyó una IgG anti-cabra marcada con biotina-estreptavidina/peroxidasa (Dako; cat. K0690) y

el cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (Dako; cat. K3469). La inmunomarcación (IHQ) fue gentilmente realizada en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Minnesota, USA (Vet. Federico Giannitti).

2.10.4 Detección de RVA y caracterización molecular de las cepas

Las muestras de MF y CI fueron analizadas por ELISA indirecto de captura (apartado 2.4) para detectar Ag de RVA. Aquellas muestras con lecturas de OD corregida mayores a 0,500 fueron seleccionadas para confeccionar un pool (MF y CI) por cada ternero desafiado con su respectiva cepa. Para confirmar si los genotipos presentes en las muestras de los terneros se correspondían con aquellos de las cepas utilizadas como inóculos, se realizó la RT-PCR y secuenciación de VP7 y VP8* utilizando el ARN extraído de cada pool (apartado 2.6, Tablas 1.2 y 5.2). Adicionalmente, se realizó la RT-PCR semi-anidada y múltiple de VP7 (apartado 2.6.2) para confirmar la ausencia de co-infecciones por cepas de campo.

2.10.5 Titulación de las cepas de RVA

El título infeccioso se evaluó utilizando la técnica de IF en cultivo celular (IFCC) (Parreño *et al.*, 2004). Con el material de cada pool se hicieron diluciones seriadas en base 10 utilizando medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle's (MEM-E) (Gibco; cat. #41500-034), adicionado con antibióticos (Gibco, cat. 15240-062) (ATB 1X) y 1% de pancreatina (Sigma-Aldrich and Co, cat. P3292) (*Apéndice 2*). La titulación se hizo sobre monocapas confluentes de células MA-104 (80% o más de confluencia) sembradas en placas de 96 pocillos. Las células se infectaron con 100 µl del sobrenadante del inóculo en cada pocillo. Luego de 48 h de incubación en estufa (37 °C, 5% CO₂), se descartó el sobrenadante y las monocapas infectadas se fijaron con acetona (70%) durante 15 min. a TA. Las células infectadas con el virus se revelaron con una dilución (1/150) de suero hiperinmune anti-RV conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El número de unidades formadoras de focos fluorescentes (UFF) se determinó por lectura en un microscopio de fluorescencia (Olympus). Adicionalmente, se realizó la titulación de cada pool empleando la técnica de ELISA indirecto de captura (apartado 2.4). Para ello se hicieron diluciones seriadas en base 10 con el material de cada pool diluido en MEM-E o en PBS-T.

2.11 Adaptación de RVA a cultivo celular

2.11.1 Selección de la cepa

Se utilizó una cepa G6(III)P[11] autóctona de tambo, la cual fue genotipificada por RT-PCR semi-anidado y múltiple (ver apartados 2.6.2 y 2.6.3) y por análisis de las secuencias nucleotídicas de VP7 y VP8*. Esta cepa fue previamente multiplicada en uno de los terneros descalostrados (apartado 2.10). La cepa fue gentilmente cedida por las Dras. Lorena Garaicoechea y Viviana Parreño (Lab. Virus Entéricos, Instituto de Virología, CICVyA INTA Castelar).

2.11.2 Cultivo celular

Para adaptar la cepa G6(III)P[11] a cultivo celular se utilizó la línea celular MA104 (pasaje 64), proveniente de riñón fetal de mono Rhesus. Las células se cultivaron en botellas T25 (25 cm²) y T75 (cm²), utilizando MEM-E (Gibco; cat. 41500-034) adicionado con antibióticos (Gibco, cat. 15240-062) (ATB 1X) (MEM-E + ATB 1X) (*Apéndice 2*) y suero fetal bovino (SFB) al 10%; para mantenimiento del cultivo se utilizó SFB al 2%. Los cultivos se incubaron en estufa (37 °C, 5% de CO₂) por un mínimo de 48 h, hasta obtener una monocapa uniforme (80% o más de confluencia).

2.11.3 Preparación del inóculo e infección del cultivo celular

El inóculo se preparó diluyendo (p/v, 1/10) el pool de muestras (MF y CI) en MEM-E + ATB 2X con el agregado de pancreatina (25 µg/ml) (Sigma-Aldrich and Co, cat. P3292) (*Apéndice 2*). La monocapa de células se lavó con MEM-E + ATB 2X para quitar los restos de SFB. Posteriormente, las botellas se infectaron con 4 ml de inóculo y se dejaron adsorbiendo en estufa a 37 °C (5% CO₂) durante 1 h. Posteriormente, se descartó el inóculo y se agregó 7 ml de MEM-E + ATB 2X con el agregado de pancreatina (25 µg/ml). A las 24 hpi se descartó el medio y se agregó MEM-E + ATB 1X adicionado con pancreatina (25 µg/ml). Una vez observado el efecto citopático (ECP), se realizaron pasajes sucesivos procediendo de la misma manera, aunque en estos pasajes no se cambió el medio a las 24 hpi.

3. Resultados

3.1 Circulación de RVA y CoVB en establecimientos de la provincia de Buenos Aires

La presencia de RVA y CoVB en los establecimientos de ambos sistemas productivos se detalla en la Figura 1.2. La proporción de tambos en los cuales circuló RVA (15/18), ya sea sólo o asociado a CoVB, fue similar a la registrada en los campos de cría (12/14). El análisis de los datos indicó que más del 80% de los establecimientos de ambos sistemas productivos presentaron al menos un ternero positivo a RVA al momento del muestreo. En cambio, la proporción de establecimientos con circulación de CoVB fue menor (3/18) y la misma estuvo restringida a los establecimientos lecheros. Además, la presencia de CoVB siempre estuvo acompañada por la circulación simultánea de RVA.

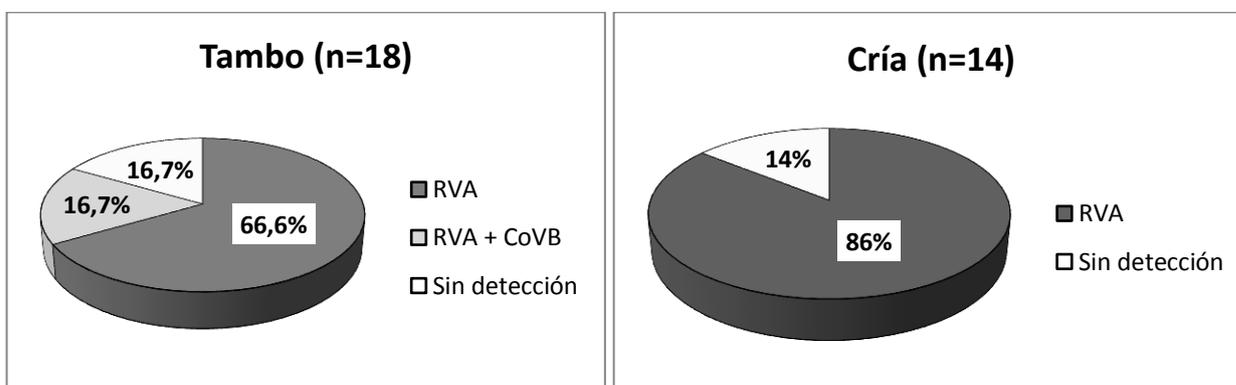


Figura 1.2. Circulación de RVA y CoVB en tambos y campos de cría para carne ubicados en la provincia de Buenos Aires. La detección de Ags virales se realizó por ELISA y cada establecimiento fue clasificado como positivo cuando al menos un ternero resultó positivo para uno de los virus evaluados.

3.2 Detección de RVA y CoVB en terneros según el sistema de producción y la condición clínica

De la totalidad de terneros evaluados, el 16,8% (71/422) presentó infecciones simples por RVA, el 0,4% (2/422) mostró infecciones simples por CoVB y el 0,7% (3/422) desarrolló infecciones combinadas de RVA y CoVB. La frecuencia de detección de CoVB fue mucho menor a la registrada para RVA y las infecciones simples por CoVB o las infecciones combinadas de RVA y CoVB sólo se registraron en los terneros de tambo. Al momento del muestreo el 82% (346/422) de los terneros no presentó infecciones por ninguno de los virus analizados.

Teniendo en cuenta el sistema productivo para el análisis, las infecciones por RVA se detectaron en el 22% (40/182) de los terneros de cría para carne y en el 14% (34/240) de los terneros tambo. Esta diferencia fue significativa (valor $\chi^2 = 4,3$; g.l. = 1; $p < 0,05$), lo cual

indica que los terneros de cría tuvieron un mayor riesgo de infección por RVA (OR = 1,7; IC 95%, 1,03 - 2,83) en comparación con los de tambo (Apéndice 1). Las infecciones por CoVB se presentaron en el 2,1% (5/240) de los terneros de tambo, de las cuales el 0,8% (2/240) fueron simples y el 1,2% (3/240) combinadas con RVA.

Con respecto a la asociación entre la condición clínica de los terneros y la infección simple por RVA, el 24,3% (58/239) de los terneros diarreicos y el 7,2% (13/181) de los terneros sin diarrea fueron positivos a RVA. Esta diferencia fue significativa (valor $\chi^2 = 21,6$; g.l. = 1; $p < 0,01$) y los terneros con diarrea tuvieron 4 veces más posibilidades de excretar RVA que aquellos sin diarrea (OR = 4,2; IC 95%, 2,2 - 7,8). Esta asociación se mantuvo aún cuando se controló la variable sistema de producción. Para ello se realizó un análisis combinando los OR de cría y tambo mediante la prueba de Mantel-Haenszel. Este análisis demostró que un ternero con diarrea tiene mayor riesgo de estar infectado por RVA (OR = 4,23; IC 95%, 2,2 - 8,05) y el sistema productivo no fue una variable de confusión (χ^2 Mantel-Haenszel, 20,4; $p < 0,05$) (Apéndice 1).

En la Figura 2.2 se detallan los porcentajes de terneros con infecciones simples por RVA de acuerdo a la condición clínica y al sistema productivo. En cría para carne, la frecuencia de infecciones simples fue mayor en los terneros diarreicos (32/104) con respecto a aquellos sin diarrea (8/78). Asimismo, las infecciones simples por RVA fueron más frecuentes en los terneros de tambo con diarrea (26/134) que en aquellos sin diarrea (5/103).

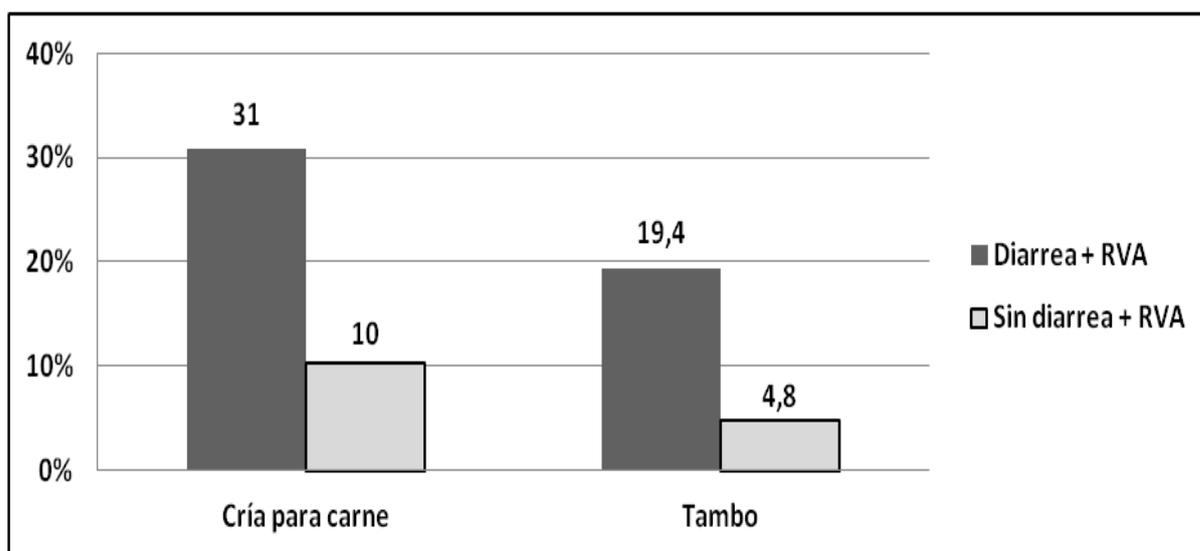


Figura 2.2. Porcentajes de terneros diarreicos y sin diarrea con infecciones simples por RVA en ambos sistemas de producción. Los resultados se expresan a partir de la detección de RVA por ELISA.

Analizando las relaciones entre los sistemas productivos y las infecciones simples por RVA en terneros con diarrea, se pudo establecer una asociación entre dichas variables. El porcentaje de terneros de cría con diarrea y positivos a RVA fue significativamente mayor ($p = 0,043$) al porcentaje registrado en terneros de tambo con diarrea. Los terneros de cría con diarrea tuvieron 1,8 veces más posibilidades de excretar RVA que los terneros de tambo diarreicos (OR = 1,8; IC 95%, 1,02 - 3,35) (Apéndice 1). No obstante, en ambos sistemas productivos hubo terneros que presentaron infecciones subclínicas por RVA.

Las variables ingresadas (sistema productivo y condición clínica) en el modelo final de regresión logística fueron retenidas. La prueba de Hosmer y Lemeshow no resultó significativa ($p > 0,05$), lo cual indicó un ajuste adecuado del modelo. El sistema de producción (OR = 1,7; $p = 0,033$) y la condición clínica (OR = 4,4; $p < 0,01$) mantuvieron su significancia como variables asociadas al riesgo de infección por RVA (Apéndice 1).

3.3 Genotipificación de RVA bovino

Un total 67 de muestras positivas a RVA de tambo ($n = 34$) y cría ($n = 33$) fueron seleccionadas para realizar la caracterización molecular de los genotipos G y P. Luego de la primera ronda de amplificación (RT-PCR), se obtuvieron los productos correspondientes a VP7 (Fig. 3.2) y VP8* (Fig. 4.2) en el 86,6% y 94% de las muestras analizadas, respectivamente.

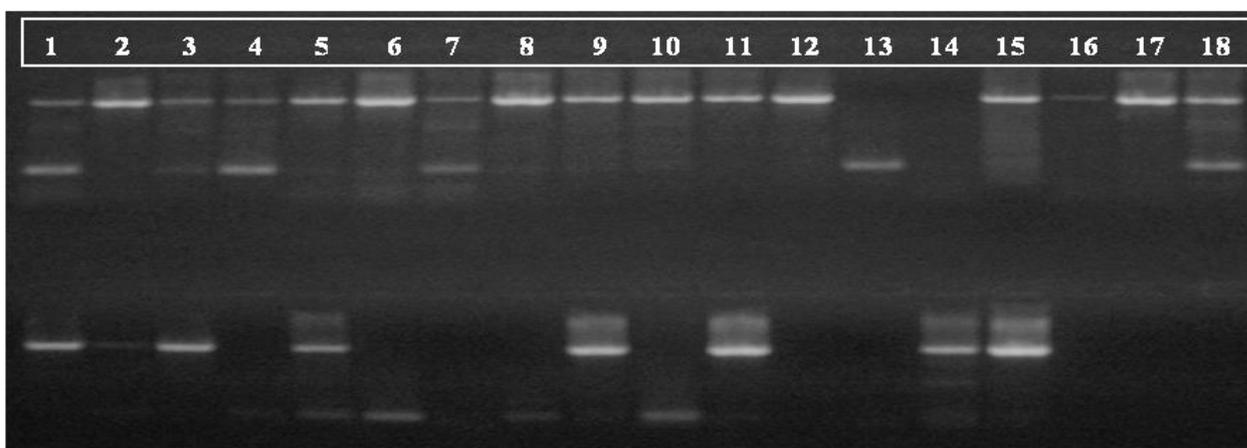


Fig. 3.2. Resultados de RT-PCR para el gen codificante de VP7 (1062 pb). Calles 1-18 (fila de arriba): muestras de tambo 4385-VT, 27412-VA, 3-Profam, C-LM, 10-SC, 14-SC, 16-SC, 9-DM, A-LE, 7765-LE, 21-DA, 22-DA, C-DC, J-DC, 3-LSyLM, 6571-LSyLM, 6590-LSyLM, B-EC. Calles 1-11 (fila de abajo): muestras de tambo 171-LA, 173-LA, 174-LA, 4820-DR, 4878-DR, 4884-DR, 4871-DR, 4866-DR, 4894-DR, 4993-DR, 9-DM. Calles 12-15 (fila abajo): mezcla RT-PCR (control negativo), MF control negativo, MF control positivo, ARN MF positiva (control positivo). Gel de agarosa (1,8%) teñido con bromuro de etidio y fotografiado.

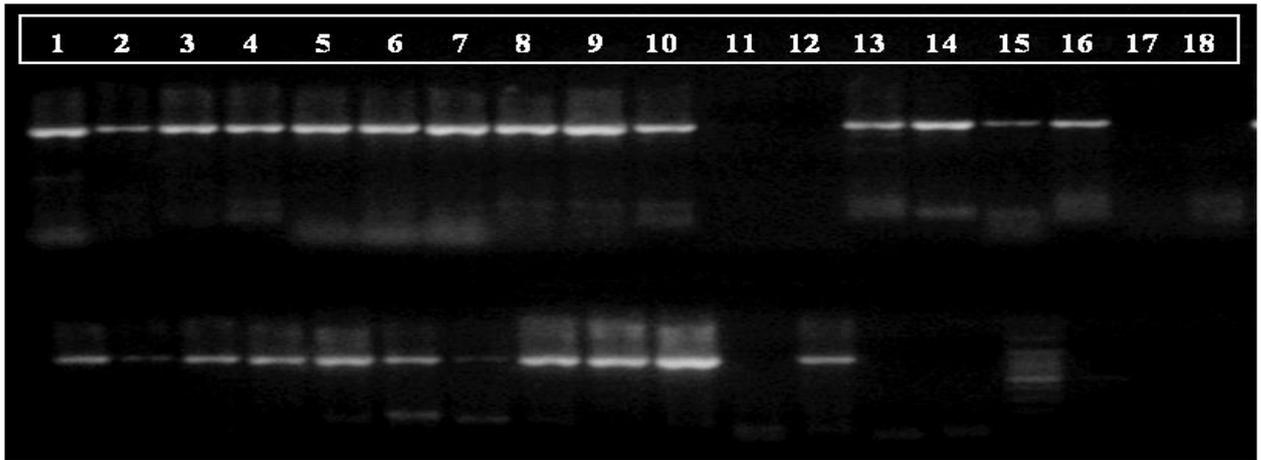


Fig. 4.2. Resultados de RT-PCR para el gen codificante de VP8* (877 pb). Calles 1-18 (fila de arriba): muestras de tambo 4385-VT, 27412-VA, 3-Profam, C-LM, 10-SC, 14-SC, 16-SC, 9-DM, A-LE, 7765-LE, 21-DA, 22-DA, C-DC, J-DC, 3-LSyLM, 6571-LSyLM, 6590-LSyLM, B-EC. Calles 1-14 (fila de abajo): muestras de tambo 173-LA, 174-LA, 4820-DR, 4878-DR, 4884-DR, 4871-DR, 4866-DR, 4894-DR, 4993-DR, MF control positivo, MF control negativo, ARN MF positiva (control positivo), mezcla RT-PCR (control negativo), mezcla PCR (control negativo), marcador peso molecular (100 pb). Gel de agarosa (1,8%) teñido con bromuro de etidio y fotografiado con luz UV.

Las especificidades de los genotipos G se determinaron en el 91% (61/67) de las muestras analizadas, mientras que las especificidades de los genotipos P se identificaron en el 100% (67/67) de las mismas. Expresando los resultados de ambos sistemas productivos en forma conjunta, las muestras fueron caracterizadas como G6(IV) (51%), G6(III) (22,5%), G10 (4,5%) (Fig. 5.2), G8 (1,5%) e infecciones mixtas (12%) por más de un genotipo G. El genotipo G6 (ambos linajes) fue el más prevalente y se detectó en el 73,4% de las muestras positivas a un solo genotipo G.

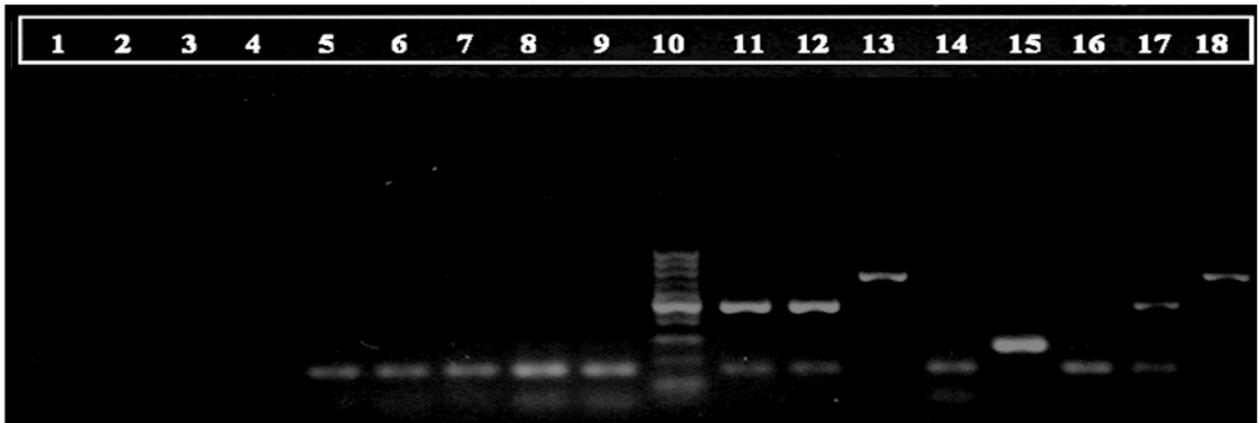


Fig. 5.2. Resultados de PCR semi-anidada y múltiple para genotipos G. Calles 1-4: ARN MF negativa (control negativo), mezcla de RT-PCR (control negativo), mezclas de RT-PCR y PCR semi-anidada y múltiple (control negativo), mezcla de PCR semi-anidada y múltiple (control negativo). Calles 5-9: muestras de tambo 5609-DR, 2029-DR, 5591-DR, 5611-DR y 1997-DR (genotipo G6(IV), 168 pb). Calle 10: marcador peso molecular (100 pb). Calles 11-12: muestras de tambo 4878-DR y 4894-DR (genotipo G6(III), 168 y 500 pb). Calle 13: muestra de tambo 6-DR (genotipo G10, 715 pb). Calle 14: ARN MF positiva (control positivo). Calles 15-18: cepa NCDV Cody I801 (G8P[1], 273 pb), cepa Indiana (G6(IV)P[5], 168 pb), cepa de campo (G6(III)P[11], 168 y 500 pb) y cepa B223 (G10P[11], 715 pb). Gel de agarosa (1,8%) teñido con SYBR Safe y fotografiado con luz UV.

Los genotipos P caracterizados en las muestras incluyeron a P[5] (58,2%) (Fig. 6.2), P[11] (37,3%) e infecciones mixtas por P[5+11] (4,5%) (Figs. 6.2 y 7.2); en ninguna muestra se detectó el genotipo P[1]. Las infecciones mixtas por diferentes genotipos G y/o P se presentaron en el 13,4% de las muestras analizadas.

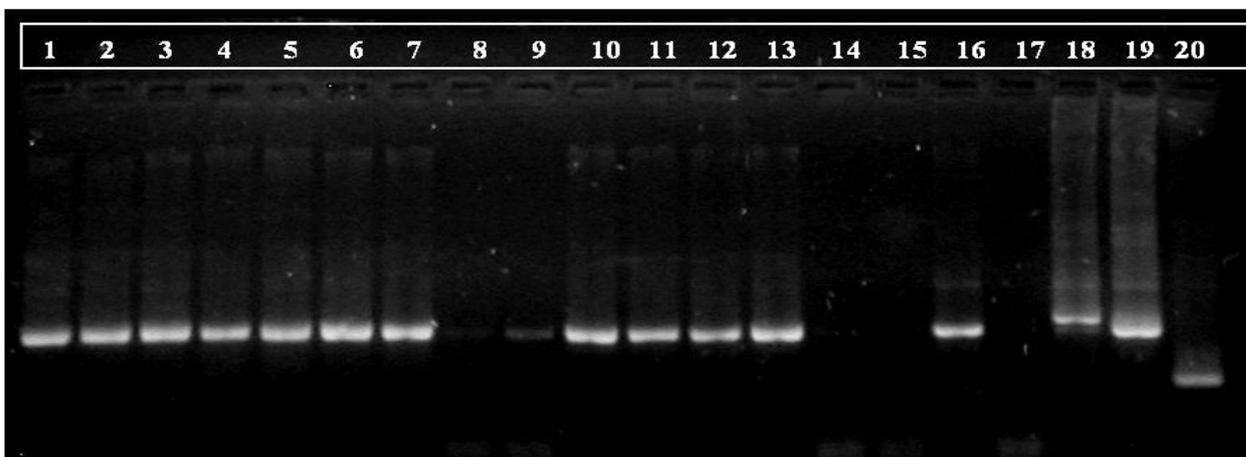


Fig.6.2. Resultados de PCR semi-anidada y múltiple para genotipos P. Calles 1-15: muestras de cría identificadas como 1-EA, 3-EA, 5-EA, 6-EA, 16-EA, 21-SA, 23-SA, 24-SA, 27-SA, 30-SA, 30-SA (d), 47-SA, 51-SA, 1-56-SA, 57-SA. Calles 16-20: MF control positivo, MF control negativo, cepa NCDV Cody I-801 (G8P[1], 622 pb), cepa Indiana (G6P[5], 555 pb), cepa B223 (G10P[11], 314 pb). Gel de agarosa (1,8%) teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV.

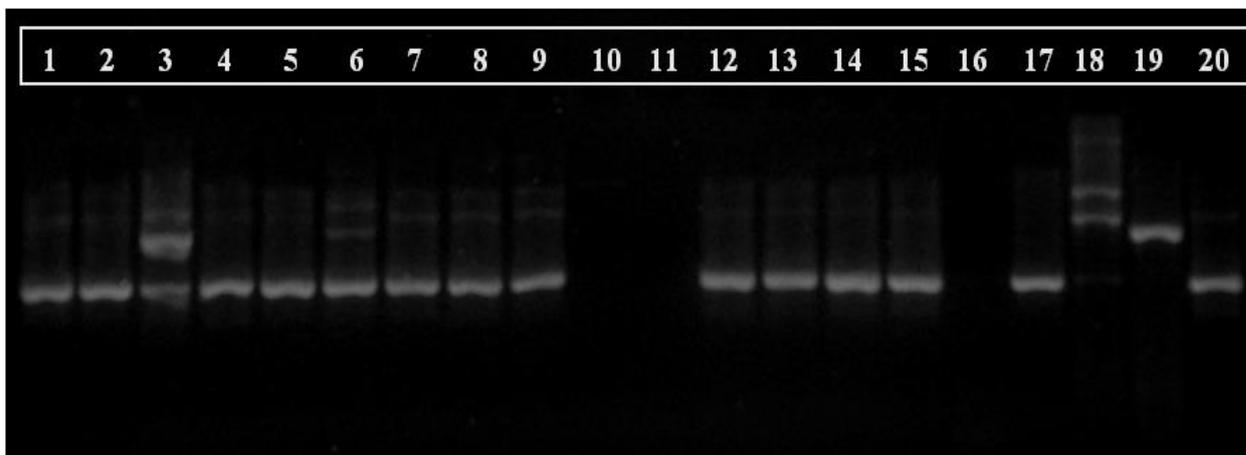


Fig. 7.2. Resultados de PCR semi-anidada y múltiple para genotipos P. Calles 1-17: muestras de tambo 4385-VT, 27412-VA, 3-Profam, C-LM, 10-SC, 14-SC, 16-SC, 9-DM, A-LE, 7765-LE, 21-DA, 22-DA, C-DC, J-DC, 3-LSyLM, 6571-LSyLM, 6590-LSyLM. Calles 18-20: cepa NCDV Cody I-801 (G8P[1], 622 pb), cepa Indiana (G6P[5], 555 pb), cepa B223 (G10P[11], 314 pb). Gel de agarosa (1,8%) teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV.

La distribución de los genotipos G y P en las muestras de cada sistema productivo se detallan en las Figuras 8.2 y 9.2, respectivamente. Existieron diferencias evidentes en la frecuencia y diversidad de los genotipos G y P en función del sistema productivo. En cría para carne predominaron los genotipos G6(IV) y P[5]. Por el contrario, en tambo hubo una mayor

diversidad de genotipos G, entre los cuales predominaron G6(III), G6(IV)+G10 y G6(IV) en combinación, principalmente, con el genotipo P[11].

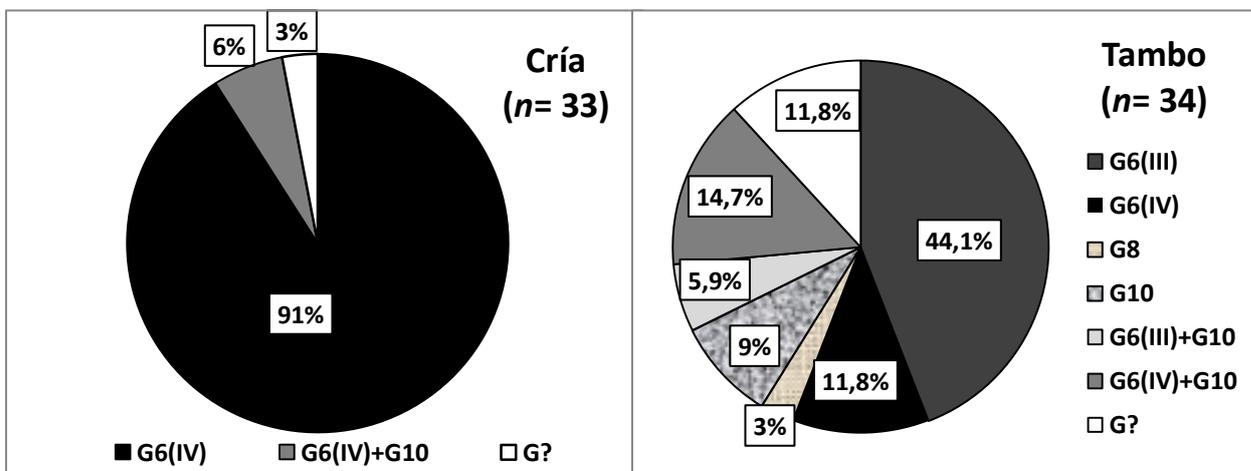


Figura 8.2. Frecuencia y distribución de los genotipos G en muestras de materia fecal recolectas en terneros de cría y tambo.

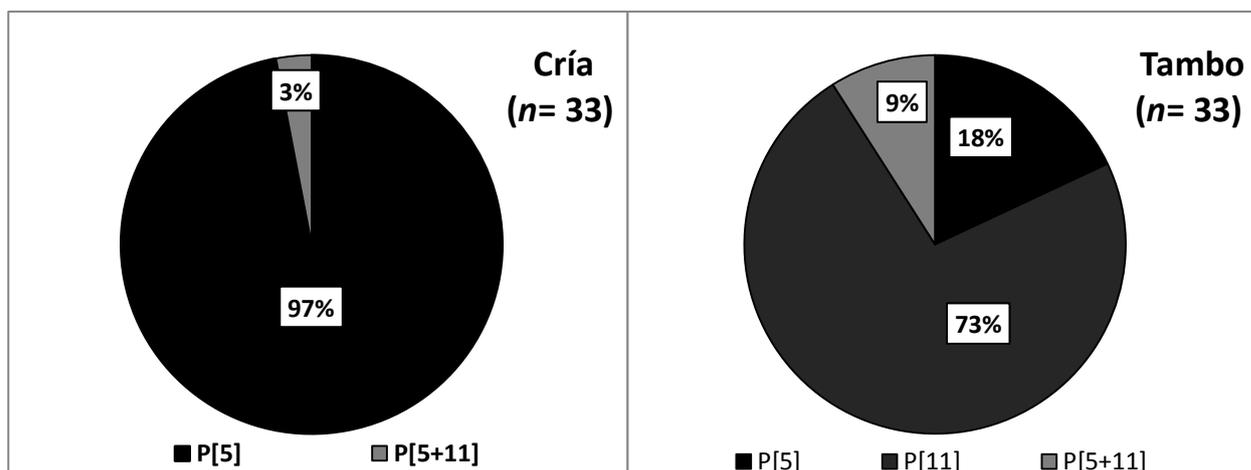


Figura 9.2. Frecuencia y distribución de los genotipos P en muestras de materia fecal recolectadas en terneros de cría y tambo.

Las combinaciones de genotipos G y P en las muestras de terneros de tambo indicaron una mayor diversidad genética con respecto a las muestras de cría (Tabla 10.2). Además, las infecciones mixtas por diferentes genotipos G y/o P fueron más frecuentes en tambo, representando el 23,5% de las muestras analizadas en dicho sistema productivo. En un ternero de tambo se presentó una infección simple por el genotipo G8P[11]. Este hallazgo resulta relevante, ya que en Argentina nunca se había reportado una infección simple por una cepa G8P[11]. En aquellos terneros que presentaron infecciones combinadas por RVA y CoVB, las cepas presentaron los genotipos G6(III)P[11] y G8P[11].

Tabla 10.2. Frecuencias para las combinaciones de genotipos G y P en muestras de terneros de cría y tambo

Tipos G y P	No (%) de muestras positivas		
	Cría	Tambo	Total
G6(IV)P[5]	30(91)	3(8,8)	33(49)
G6(III)P[11]	-	14(41,2)	14(21)
G8P[11]	-	1(3)	1(1,5)
G10P[11]	-	3(8,8)	3(4,5)
G6(IV)+G10P[11]	1(3)	2(5,8)	3(4,5)
G6(IV)+G10P[5]	-	1(3)	1(1,5)
G6(III)+G10P[11]	-	2(5,8)	2(3)
G6(IV)P[5+11]	-	1(3)	1(1,5)
G6(III)P[5]	-	1(3)	1(1,5)
G6(IV)+G10P[5+11]	-	2(5,8)	2(3)
G? P[5]	2(6)	2(5,8)	4(6)
G? P[11]	-	2(5,8)	2(3)
Total	33	34	67

En cuanto a la circulación de los genotipos a nivel de los establecimientos, las infecciones simples por G6(IV)P[5] fueron identificadas en el 91,6% de los campos de cría. En cambio, las infecciones simples y mixtas por el genotipo G6(III)P[11] estuvieron presentes en el 53,3% de los tambos, seguidas por G10P[11] (40%) y G6(IV)P[5] (26,6%). Las infecciones mixtas asociadas a diferentes genotipos G y/o P se registraron en el 8,3% de los campos de cría y en el 40% de los tambos.

3.4 Estudio longitudinal de RVA y CoVB en un establecimiento lechero

El tambo “DR” presentó brotes sucesivos de DNT en los cuales circuló principalmente RVA. Las tasas de detección de RVA en las muestras analizadas fueron del 36,8% (7/19) en 2009, 58,3% (7/12) en 2010 y 50% (2/4) en 2011. CoVB sólo pudo ser identificado en las muestras recolectadas durante el año 2009, con una tasa de detección del 15,8% (3/19) y la mayoría de estas muestras también fueron positivas a RVA (10,5%, 2/19).

En el gráfico de frecuencias (Fig. 10.2) se indican las combinaciones de los genotipos G y P de RVA que fueron identificadas en las muestras obtenidas en los diferentes años. En el mismo se observa una variación temporal de las combinaciones que prevalecieron en cada muestreo realizado.

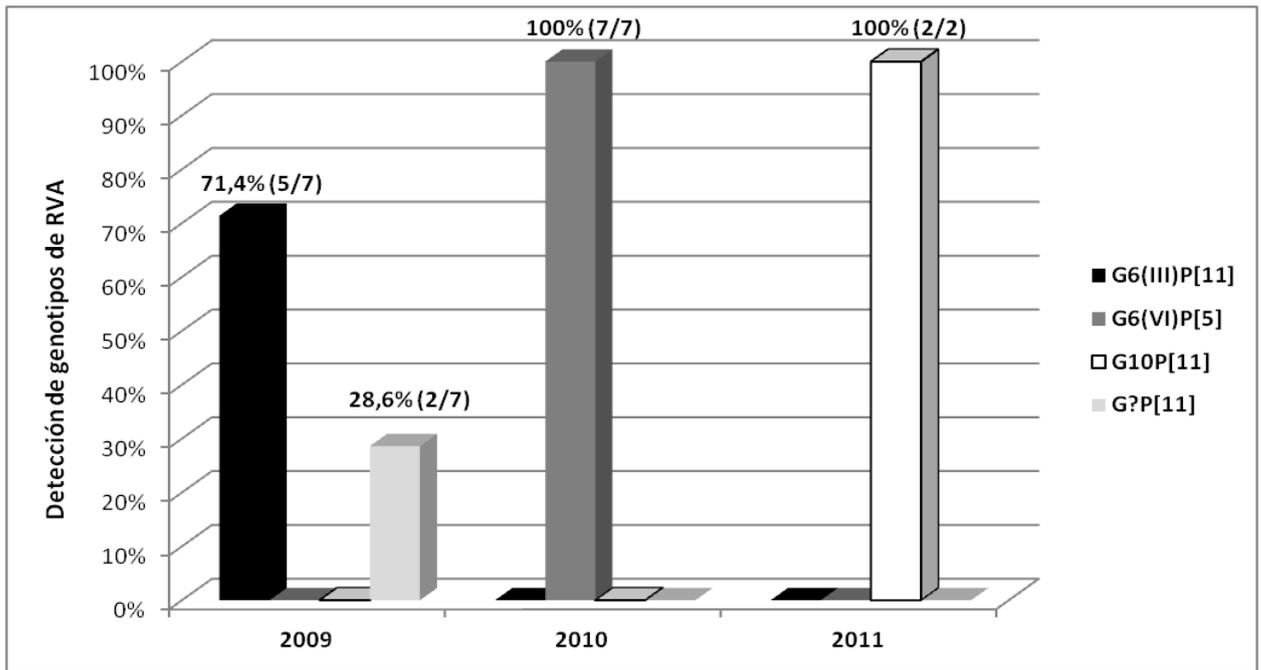


Fig.10.2. Caracterización de los genotipos G y P en el establecimiento “DR”. Las muestras de MF fueron recolectadas en diferentes años. Los valores de porcentaje se expresan en relación a las muestras positivas a RVA por ELISA.

3.5 Análisis filogenético de las cepas circulantes de RVA bovino

3.5.1 Linajes de las cepas correspondientes al genotipo G8

La topología del dendrograma del genotipo G8 fue reconstruida con las secuencias correspondientes a un total de 75 cepas obtenidas de bovino (20 cepas), humano (43), porcino (5), guanaco (2), ovino (1), caprino (1), vicuña (1), mono Rhesus (1) y medio ambiente (1). En el árbol quedaron definidos 5 linajes (I, II, III, IV y V), aunque una cepa bovina (Cody_I801, G8P[1]) y una cepa humana (UP30, G8PX) no agruparon en ninguno de los linajes establecidos (Fig. 11.2). Por lo tanto, estas cepas podrían representar a 2 linajes adicionales, ya que sus distancias genéticas con respecto a las otras cepas son mayores al punto de corte (Fig. 12.2).

El linaje I agrupó cepas humanas G8 de diferentes países, fundamentalmente de África, las cuales presentaron diferentes tipos P (P[4], P[6] y P[8]). Además, el linaje I incluyó a una cepa bovina de Nigeria (NGRBg8, G8P[X]). El linaje II estuvo conformado, principalmente, por cepas humanas G8P[4] y G8P[8] de Europa y África. El linaje III quedó constituido por un gran número de cepas que fueron obtenidas de distintas especies de animales (bovino, oveja, cabra, guanaco, vicuña, cerdo y macaco Rhesus) y humanos. Dichas cepas presentaron diferentes especificidades para el tipo P (P[1], P[4], P[11] y P[14]).

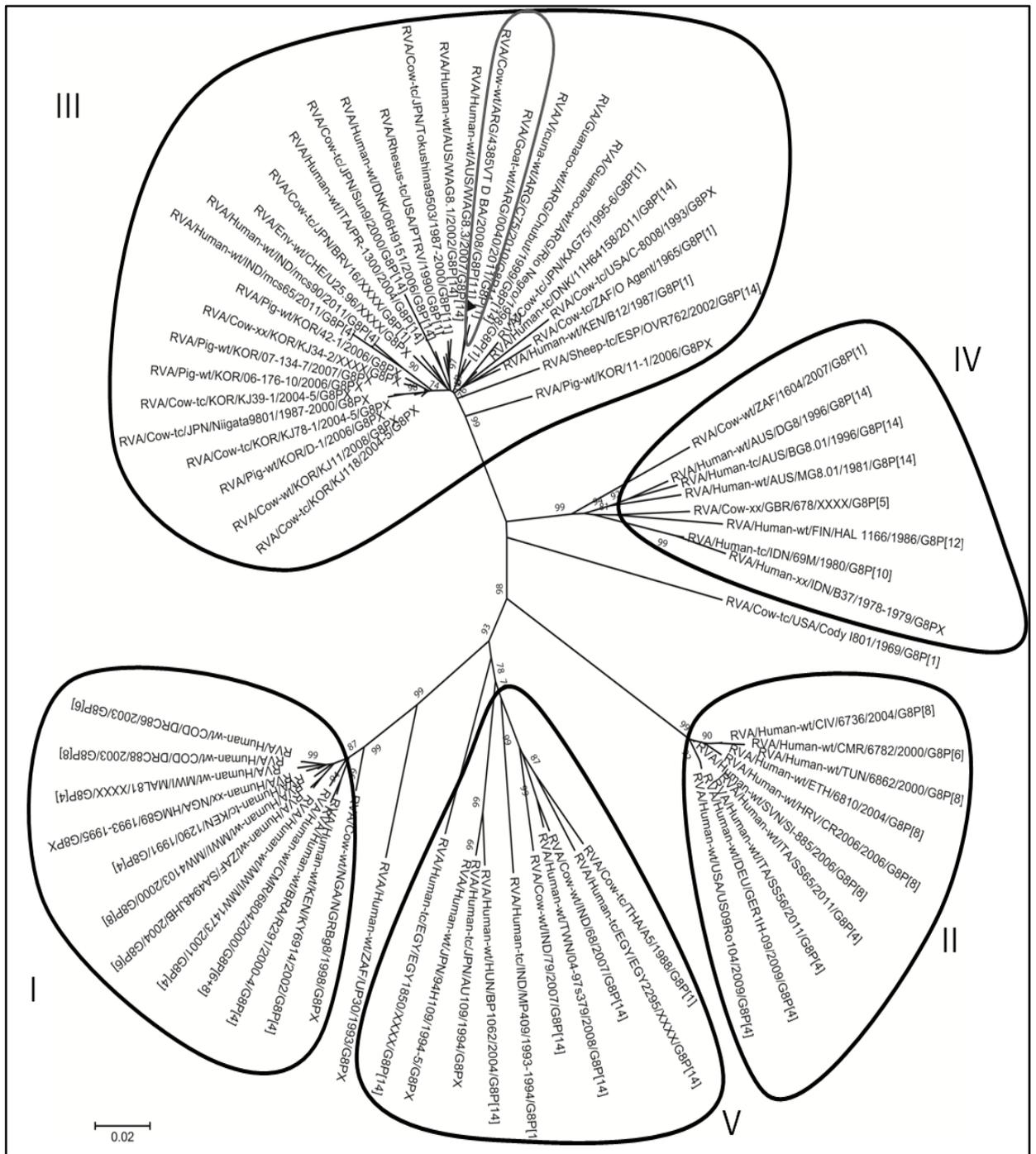


Fig. 11.2. Árbol filogenético del genotipo G8 reconstruido con secuencias de nucleótidos de VP7. Se utilizó el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los linajes se indican con círculos de contorno negro y números romanos. La cepa bovina 4385VT_D_BA (G8P[11]) se identifica con un símbolo (▲) que representa la cuenca lechera “Mar y Sierras”. Dentro del linaje III se muestra, con un círculo de contorno gris, la estrecha relación filogenética entre la cepa bovina 4385VT_D_BA (G8P[11]) y la cepa de cabra 0040 (G8P[1]), ambas de Argentina.

El linaje IV agrupó cepas humanas G8P[12] de Finlandia (HAL 1166), G8P[14] de Australia (DG8, BG8.01, MG8.01), G8P[10] y G8PX de India (69M y B37, respectivamente). Además, en este linaje quedaron incluidas las cepas bovinas G8P[1] de Sudáfrica (1604) y

G8P[5] del Reino Unido (678). En el linaje V agruparon cepas humanas G8P[14] de Egipto (EGY1850 y EGY2295), Hungría (BP1062) y Taiwán (04-97s379), así como también cepas bovinas de India (68 y 79). Además, este linaje incluyó cepas humanas G8P[1] de India (MP409) y Tailandia (A51), y cepas G8PX de Japón (AU109 y 94H109).

La primera cepa bovina G8P[11] de Argentina (4385VT_D_BA, G8P[11]), identificada en el presente estudio, agrupó dentro del linaje III y mostró una íntima relación filogenética con una cepa de cabra (0040, G8P[1]), la cual fue descrita recientemente en Argentina (Louge Uriarte *et al.*, 2014). Ambas cepas fueron obtenidas en establecimientos productores de leche que se encontraban ubicados muy próximos geográficamente (tambo bovino, Mar Chiquita; tambo caprino, Gral. Pueyrredón). Por otra parte, la cepa bovina 4385VT_D_BA (G8P[11]) también mostró una estrecha relación filogenética con cepas argentinas de vicuña (75, G8P[14]) (Badaracco *et al.*, 2013a) y de guanaco (Rio_Negro, G8P[1] y Chubut, G8P[14]) (Matthijnsens *et al.*, 2009).

El gráfico de frecuencias para las distancias genéticas entre las cepas de un mismo linaje (intra linaje) y entre las cepas de diferentes linajes (entre linajes) permitió establecer, para esta serie de datos, un punto de corte aproximado del 11% de distancia genética (89% de similitud nucleotídica) (Fig. 12.2).

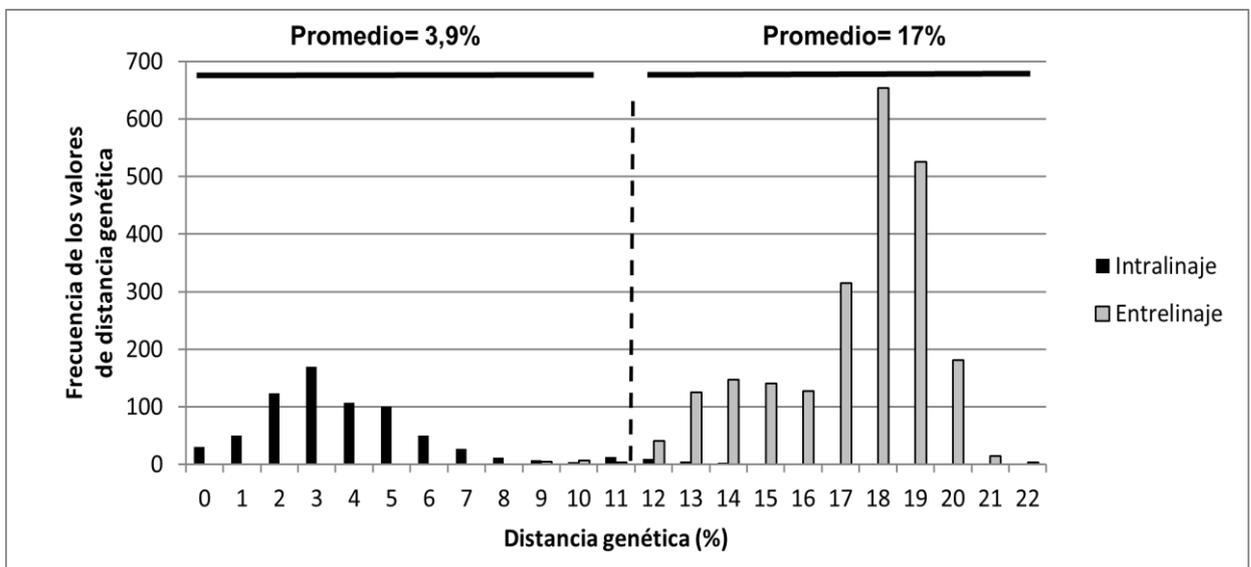


Fig. 12.2. Frecuencias de valores, expresados en porcentaje, para las distancias genéticas de a pares. Se indican los valores promedio para las distancias genéticas intra linaje o entre linajes. Los valores de las frecuencias se indican en el eje de las ordenadas (y) y los valores de las distancias en el eje de las abscisas (x). La línea de discontinua representa el punto de corte, expresado como distancia genética, para diferenciar los linajes.

Las distancias genéticas de a pares dentro de cada linaje y las comparaciones entre los diferentes linajes se detallan a continuación (Tabla 11.2). Los análisis bioinformáticos permitieron confirmar los 5 linajes (I, II, III, IV y V) observados en el árbol filogenético (Fig. 11.2). Este resultado amplía el número linajes (I, II y III) que previamente se había propuesto (Nakagomi *et al.*, 2012, Ianiro *et al.*, 2014).

Tabla 11.2. Valores promedio, expresados en porcentaje, para las distancias genéticas dentro de cada linaje y entre los diferentes linajes

Linajes	I	II	III	IV	V
I	2,4				
II	17,2	1,2			
III	18,1	18,6	3,7		
IV	18,7	19,1	13,6	7,7	
V	15	18	18	17	10

Las similitudes en las secuencias de nt y aa de la región codificante para VP7 fueron comparadas. En el análisis se incluyó la cepa 4385VT_D_BA (G8P[11]) y diferentes cepas G8, las cuales fueron seleccionadas teniendo en cuenta la topología del árbol filogenético y los resultados del alineamiento local (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). La cepa 4385VT mostró una elevada identidad en las secuencias de nt y aa con respecto a las cepas argentinas de cabra 0040 (97,7% nt. y 98,4% aa.) y de camélidos Sudamericanos (> 96,7% nt. y > 98,7% aa.) (Tabla 12.2).

Tabla 12.2. Identidad en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del ORF de VP7 entre diferentes cepas G8 de animales y humanos

Cepas de rotavirus	Identidad (%)	
	VP7 (nt.)	VP7 (aa.)
RVA/Cow-wt/ARG/4385VT_D_BA/2008/G8P[11]	100	100
RVA/Goat-wt/ARG/0040/2011/G8P[1]	97,7	98,4
RVA/Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14]	97,3	98,4
RVA/Vicugna-wt/ARG/75/2010/G8P[14]	97,1	98,3
RVA/Guanaco-wt/ARG/Rio_Negro/1998/G8P[1]	96,7	98,4
RVA/Cow-xx/KOR/KJ34-2/XXXX/G8PX	96,2	98,4
RVA/Pig-wt/KOR/D-1/2006/G8PX	96,1	98,4
RVA/Human-wt/ITA/PR-1300/2004/G8P[14]	96,1	98,4
RVA/Human-wt/AUS/NTG8/2007/G8P[14]	96	98,6
RVA/Human-wt/AUS/WAG8.3/2007/G8P[14]	96	98,4
RVA/Rhesus-tc/USA/PTRV/1990/G8P[1]	96	97,7
RVA/Human-wt/DNK/06H9151/2006/G8P[14]	96	98,6
RVA/Cow-tc/JPN/Tokushima9503/1987-2000/G8P[11]	95,9	98,6

Estos resultados confirman lo observado en el análisis filogenético de VP7 para el genotipo G8. Además, algunas cepas humanas G8 (WAG8.2, PR-1300, NTG8, 06H9151) también presentaron una elevada identidad en sus secuencias de nt y aa con respecto a la cepa bovina 4385VT_D_BA (G8P[11]). La cepa bovina de referencia NCDV Cody I-801, obtenida en Estados Unidos, mostró una distancia genética importante (14,8-16% nt.) con respecto a la cepa bovina 4385VT_D_BA y a las diferentes cepas G8 de Argentina (0040, 75, Chubut y Rio_Negro).

3.5.2 Linajes de las cepas correspondientes al genotipo G6

El análisis filogenético de G6 incluyó 18 cepas obtenidas en campos de cría ($n = 10$) y tambos ($n = 8$) durante el presente estudio. Los resultados indican una concordancia completa para asignar los linajes de G6 (linajes III y IV) utilizando la técnica de RT-PCR semianidado y múltiple o el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de VP7.

El dendrograma del genotipo G6 (Fig. 13.2) indica las relaciones genéticas entre 138 cepas de origen bovino (107), humano (22), caprino (2), porcino (2), antílope (1), búfalo (1), conejo (1), pavo (1) y 1 cepa vacunal (Rotatec, Merk) que se utiliza en niños. El genotipo G6 quedó dividido en 5 linajes (I, II, III, IV y V) y coincide con lo reportado previamente (Bányai *et al.*, 2003; Garaicoechea *et al.*, 2006; Cashman *et al.*, 2010; Badaracco *et al.*, 2013b). El valor utilizado como punto de corte (13% de distancia genética) para definir los linajes de G6 fue establecido previamente (Badaracco *et al.*, 2013b).

El linaje III quedó constituido por un grupo monofilético que incluyó, principalmente, cepas bovinas G6P[11] procedentes de tambos de Argentina. Las cepas G6P[11] de tambo, obtenidas en el presente estudio, agruparon dentro de este linaje. Sin embargo, no mostraron ninguna relación filogenética próxima teniendo en cuenta la ubicación geográfica de los tambos a partir de los cuales se obtuvieron. Dentro de este linaje también se agruparon cepas bovinas reportadas recientemente en Eslovenia (SI-B8, G6PX y SI-B17, G6P[11]) (Steyer *et al.*, 2013) y Hungría (HUN-BoRo4, G6PX), así como también cepas de Irlanda (CIT-A302, G6P[5]) (Cashman *et al.*, 2010) e Italia (330, G6PX) (Monini *et al.*, 2005) que nunca habían sido analizadas filogenéticamente. Además, una cepa de búfalo (10733, G6P[3]) de Italia (Martella *et al.*, 2003) mostró una estrecha relación filogenética con una cepa G6P[11] de conejo (K1130027) de Holanda (Schoondermark-van de Ven *et al.*, 2013), la cual se cree que es de origen bovino, aunque nunca se había caracterizado su linaje de G6. Como previamente se

describió (Garaicoechea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2013b), el linaje III también incluyó a cepas humanas G6P[9] (Hun3 y Hun4) procedentes de Hungría (Bányai *et al.*, 2003).

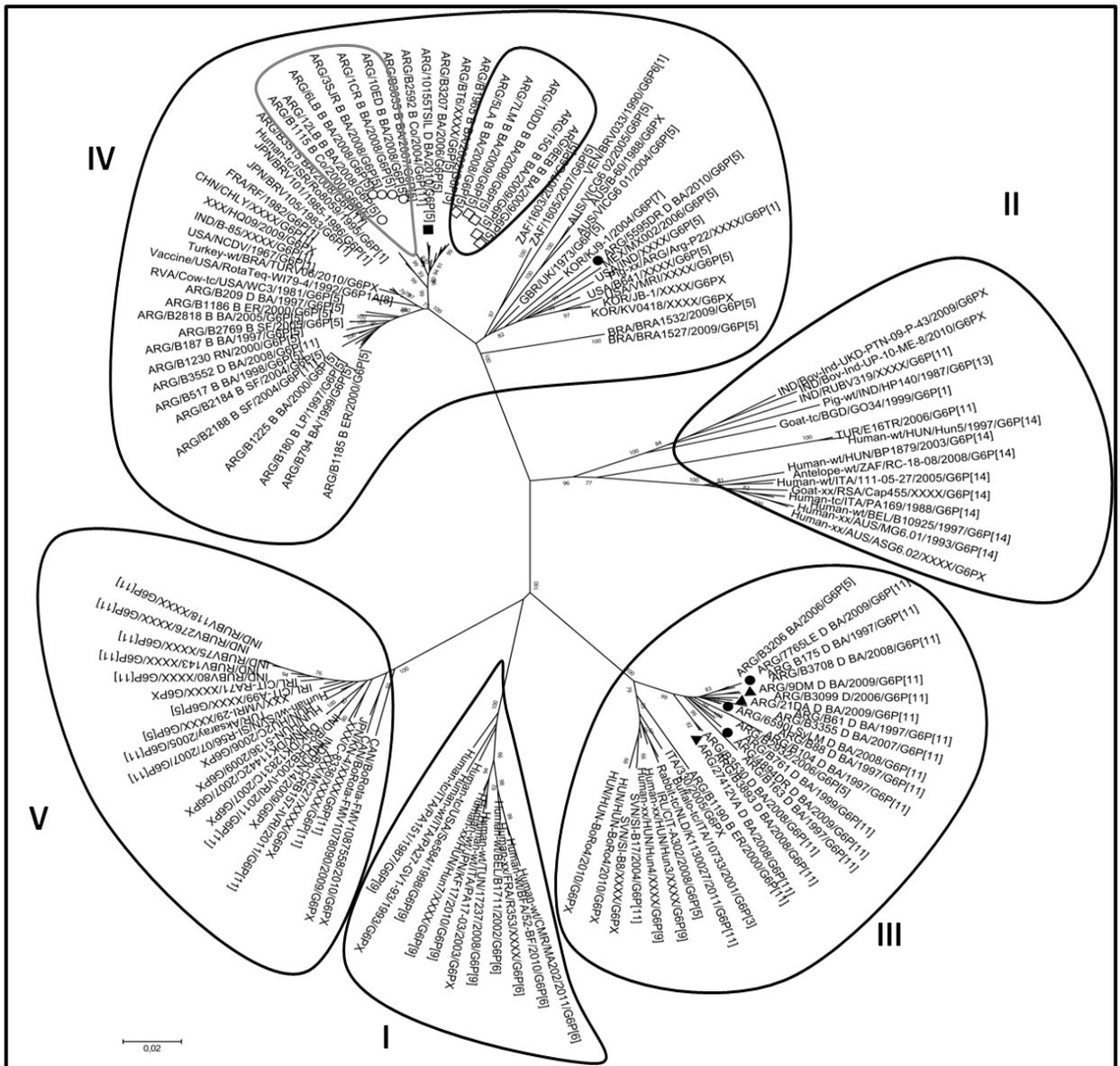


Fig. 13.2. Análisis filogenético del genotipo G6 utilizando secuencias nucleotídicas del ORF de VP7. El árbol fue reconstruido utilizando el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los linajes se indican con círculos de contorno negro y se representan con números romanos. Los círculos pequeños de contorno gris o negro señalan los subgrupos de cepas G6(IV) según su origen en las zonas de cría bovina. Los nombres de las cepas se abreviaron para facilitar su visualización. Se indica la especie de origen para todas aquellas cepas que no son bovinas. En las cepas argentinas se incluyen los nombres, tipos de explotación, provincias y años de recolección. Símbolos: cuencas lecheras “Oeste” (●), “Abasto Norte” (■), “Mar y Sierras” (▲); zonas de cría “Depresión de Laprida” (□) y “Cuenca del Salado” (○). Abreviaturas: D (tambo), B (cría), BA (Buenos Aires), SL (San Luis) y Ne (Neuquén).

El linaje IV estuvo representado por cepas bovinas de Argentina y del resto del mundo (Australia, Brasil, China, Corea, EEUU, Francia, India, Japón, Méjico, Reino Unido, Sudáfrica y Venezuela), las cuales presentaron combinaciones con diferentes tipos P (G6P[1], G6P[5] y G6P[11]). Todas las cepas G6P[5] caracterizadas en este estudio agruparon en el linaje IV. Sin embargo, fue relevante el hallazgo observado con las cepas procedentes de campos de cría, las cuales formaron 2 subgrupos de acuerdo a la ubicación geográfica de los establecimientos. Las cepas 8EB_B_BA, 15G_B_BA, 10DD_B_BA, 7LM_B_BA y 5LA_B_BA formaron un subgrupo y se obtuvieron en la zona de la Depresión de Laprida (Tabla 9.2). El otro subgrupo quedó conformado por las cepas 3SJR_B_BA, 6LB_B_BA, 12LB_B_BA, 10ED_B_BA y 1CR_B_BA, las cuales fueron recolectadas en la Cuenca del Salado (Tabla 9.2). La distancia genética promedio entre ambos subgrupos fue de 2,1% (1,9-2,2%). Otro hallazgo interesante fue la similitud (100% idénticas) en las secuencias nucleotídicas de VP7 entre las cepas 8EB_B_BA y 15G_B_BA. Las mismas fueron recolectadas en dos establecimientos diferentes que pertenecían a un mismo propietario. Al iniciar un brote de DNT en el establecimiento “EB”, las vacas preñadas y próximas a parir fueron llevadas al establecimiento “G”, con la finalidad de reducir el riesgo de infección para los terneros.

El linaje IV también incluyó a la cepa 5595DR_D_BA (G6P[5]), recolectada en un tambo de la cuenca Oeste (Tabla 9.2). Esta cepa mostró una relación filogenética relativamente cercana con cepas bovinas G6P[5] de Méjico (MX002) (Rodríguez-Limas *et al.*, 2009) y de Corea del Sur (KJ9-1), así como también con las cepas bovinas de referencia (UK, IND, VMRI y B641), aunque con respecto a estas últimas estuvo filogenéticamente más distanciada. La cepa 5595DR_D_BA es la primera en Argentina que muestra esta relación filogenética. Por otra parte, las cepas brasileras de bovino (BRA 1527 y BRA 1532, G6P[5]) y de pavo (TURV06, G6PX) (Asano *et al.*, 2011), además de una cepa argentina de porcino (Arg-P22, G6P[1]) (Parra *et al.*, 2008) y una cepa humana de Israel (Ro8059, G6P[1]) (Doan *et al.*, 2013), también agruparon dentro del linaje IV. Esto aporta nueva información, ya que nunca se habían caracterizado sus linajes.

Con respecto a los linajes de menor importancia para las cepas bovinas de Argentina, el linaje I estuvo representado, principalmente, por cepas humanas G6P[6] y G6P[9] de países africanos (Burkina Faso, Camerún y Túnez) y europeos (Italia, Hungría, Bélgica y Francia). El linaje II fue más mucho más heterogéneo y quedó conformado por cepas humanas G6P[14] (Australia, Bélgica, Hungría e Italia) y cepas de distintas especies de animales. Entre estas últimas se destacan cepas bovinas G6P[11] de India (RUBV319, entre otras) y Turquía (E16TR),

una cepa porcina G6P[13] (HP140) de India y cepas G6P[14] de antílope (RC-18-08) y cabra (Cap455) de Sudáfrica. El linaje V quedó representado, casi en su totalidad, por cepas bovinas de Canadá, Dinamarca, Hungría, India, Irlanda, Japón y Turquía.

3.5.3 Análisis de las secuencias de aminoácidos de VP7 para el genotipo G6

El alineamiento de las secuencias deducidas de aa de VP7 se presenta en la Fig. 29.2 (Apéndice 1). En el mismo se incluyó una selección de cepas bovinas G6(III) y G6(IV) de Argentina, así como también las cepas de referencia vacunales G6(IV)P[5] (UK, WC3 e IND). Estas últimas presentaron 11 prolinas conservadas, 8 cisteínas y 3 sitios posibles de glicosilación (aa. 69, 238 y 318) (Estes y Kapikian, 2007). Las cepas argentinas G6(III) y G6(IV) conservaron las 11 prolinas y las 8 cisteínas presentes en las cepas de referencia. Además, las cepas G6(IV) tuvieron los mismos sitios de glicosilación que aquellos presentes en las cepas de referencia. En cambio las cepas G6(III) no presentaron el sitio de glicosilación en la posición 318.

En la proteína V7 existen diferentes dominios antigénicos, entre ellos 7-1a (residuos 87 a 101 y 291), 7-1b (residuos 208 a 221, 189 a 190 y 233 a 242) y 7-2 (residuos 142 a 152) (Matthijnssens *et al.*, 2010). Las cepas argentinas G6(III) tuvieron 7-8 sustituciones aminoacídicas con respecto a las cepas vacunales (UK, IND y WC3) en los dominios antigénicos 7-1a (87 Val→Thr, 96 Thr→Ala, 100 Asp→Asn), 7-1b (208 Leu→Ser, 209 Ile→Thr, 242 Ala→Glu) y 7-2 (155 Asp→Ala; 158 Gln→Leu) (Fig. 29.2, Apéndice 1). En cambio, las cepas G6(IV) se mantuvieron muy conservadas en las regiones antigénicas de VP7 con respecto a las cepas vacunales G6P[5]. Sólo existieron sustituciones en un sitio del dominio 7-1a (94 Ala→Asp). Por otra parte, todas las cepas pertenecientes al subgrupo de la zona Depresión de Laprida presentaron algunas sustituciones en las secuencias deducidas de aa (posiciones 17 Thr→Ser, 29 Ile→Val y 130 Thr→Ala), las cuales no estuvieron presentes en las cepas del subgrupo de la Cuenca del Salado (Fig. 29.2, Apéndice 1). Si bien estas sustituciones no ocurrieron en los dominios antigénicos, las mismas resultan relevantes ya que se modificó la composición de aa y esto refuerza aún más el agrupamiento de las cepas según su origen.

3.5.4 Linajes de las cepas correspondientes al genotipo G10

La diversidad genética del genotipo G10 se muestra en el dendrograma reconstruido con la región codificante de VP7. Para ello se utilizaron un total de 47 cepas de bovino (35), humano (8), búfalo (1), ovino (1), equino (1) y porcino (1). El árbol filogenético quedó representado por 6 linajes (I, II, III, IV, V y VI), los cuales estuvieron soportados por altos valores de *bootstrap* (Fig. 14.2) como previamente se observó (Esona *et al.*, 2010; Badaracco *et al.*, 2013b). El valor

del punto de corte (13% de distancia genética) para definir los linajes de G10 fue establecido previamente (Badaracco *et al.*, 2013b).

Las cepas G10P[11] de tambo, secuenciadas durante este estudio (16SC_D_BA; CLM_D_BA y 3DR_D_BA), agruparon dentro del linaje VI junto a otras cepas bovinas de Argentina (Badaracco *et al.*, 2013b). Más aún, la cepa 3DR_D_BA estuvo íntimamente relacionada con una cepa humana de Brasil (R239, G10P[9]) (Volotao *et al.*, 2006). Sin embargo, no se pudo establecer ninguna asociación entre la relación filogenética de las 3 cepas y la ubicación de los tambos a partir de los cuales se obtuvieron (Fig. 14.2).

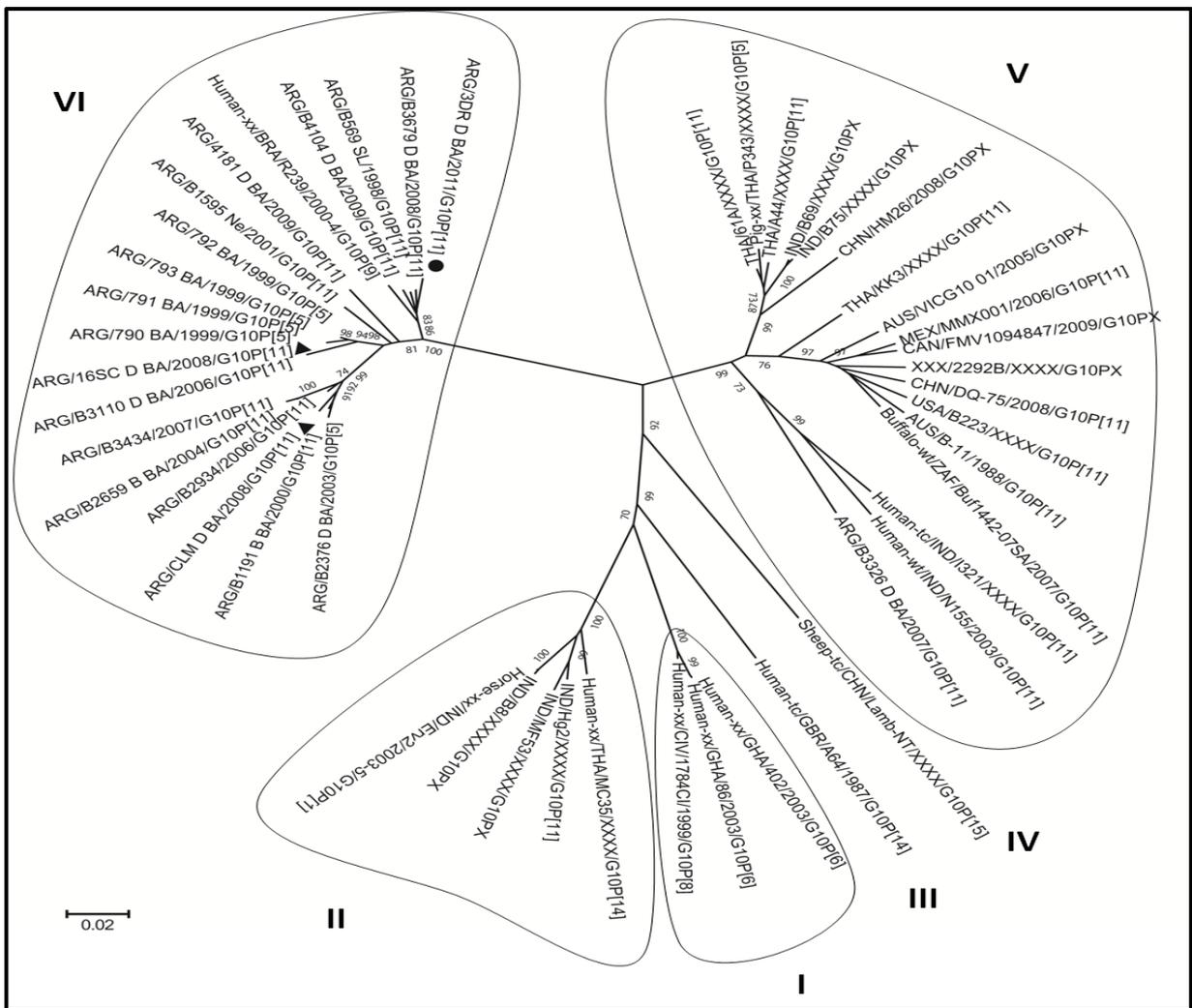


Fig. 14.2. Análisis filogenético del genotipo G10 utilizando secuencias nucleotídicas del ORF de VP7. El árbol fue reconstruido utilizando el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los linajes se indican con círculos de contorno negro y números romanos. Los nombres de las cepas se abreviaron para facilitar su visualización. Se indica la especie de origen para todas aquellas cepas que no son bovinas. En las cepas argentinas se incluyen los nombres, tipos de explotación, provincias y años de recolección. Símbolos: cuencas lecheras “Oeste” (●) y “Mar y Sierras” (▲). Abreviaturas: D (tambo), B (cría), BA (Buenos Aires), SL (San Luis) y Ne (Neuquén).

La mayoría de las cepas bovinas G10 de Australia, Méjico, China, India y Tailandia agruparon dentro del linaje V junto a la cepa bovina de referencia B223 (G10P[11]), la cual se utiliza para elaborar vacunas. Además, este linaje incluyó 1 cepa humana del Norte de Australia (SA179, G10P[14]), detectada en un niño de 4 meses con gastroenteritis aguda (Cowley *et al.*, 2013), 2 cepas reasortantes humano-bovino aisladas de niños en la India (I321, G10P[11] y N155, G10P[11]) (Ramani *et al.*, 2009), 1 cepa de búfalo de Sudáfrica (Buf1442-07SA, G10P[11]) y 1 cepa de cerdo de Tailandia (P343, G10P[5]).

3.5.5 Análisis de las secuencias de aminoácidos de VP7 para el genotipo G10

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de VP7 para las cepas G10 se muestra en la Fig. 30.2 (*Apéndice 1*). En el mismo se compararon diferentes cepas bovinas G10P[5] y G10P[11] que circularon en Argentina, la cepa bovina de referencia B223 (G10P[11]) utilizada en las vacunas y diferentes cepas humanas G10 (combinadas con P[1]/P[6]/P[8]/P[9]/P[11]/P[14]) que fueron identificadas en distintos países. La observación del alineamiento mostró que la cepa B223 tiene 11 prolinas, 8 cisteínas y 2 sitios de glicosilación (posiciones 69 y 145 del alineamiento). Las cepas argentinas G10 del linaje VI, obtenidas en este estudio y en otro previo, presentaron 10 prolinas (ausente en la posición 225) y tuvieron 4 sustituciones aminoacídicas en las regiones antigénicas 7-1a (100 Ser→Asn) y 7-1b (213 Arg→Gly, 221 Ala→Asn, 242 Ala→Thr) con respecto a la cepa vacunal B223 (Fig. 30.2, *Apéndice 1*).

Teniendo en cuenta toda la región codificante de VP7, las cepas bovinas G10 de Argentina presentaron un total de 21 sustituciones de aa con respecto a la cepa vacunal B223. La cepa humana de Brasil R239 (G10P[9]) compartió 19 de estas sustituciones (Fig. 30.2, *Apéndice 1*). Este hallazgo fortalece la estrecha relación observada a nivel filogenético (con secuencias de nt) entre las cepas bovinas G10 de Argentina y la cepa humana G10 de Brasil (Fig. 14.2). Las cepas humanas G10 del resto del mundo, las cuales serían de origen animal o bovino (al menos para algunos genes), tienen 10 sustituciones aminoacídicas que coinciden con aquellas presentes en las cepas bovinas G10 de Argentina (Fig. 30.2, *Apéndice 1*).

3.5.6 Linajes correspondientes a las cepas del genotipo P[5]

El genotipo P[5] es típico de las cepas bovinas y se encuentra asociado, principalmente, con el genotipo G6. Excepcionalmente, se han descrito cepas P[5] en equino (OH-4, G6P[5]), humano (CJN-M, G1P[5]) y porcino (S4, G3P[5] y P343, G10P[5]). La diversidad de las cepas P[5] se muestra en el árbol filogenético (Fig. 15.2), el cual fue reconstruido con las secuencias de nt de VP8* (subunidad de VP4). Para este análisis se utilizaron 11 cepas bovinas G6(IV)P[5]

de cría ($n = 9$) y tambo ($n = 2$), que fueron obtenidas durante el presente estudio, y 64 cepas de bovino (60), equino (1), humano (1) y porcino (2) disponibles en la base de datos de GenBank.

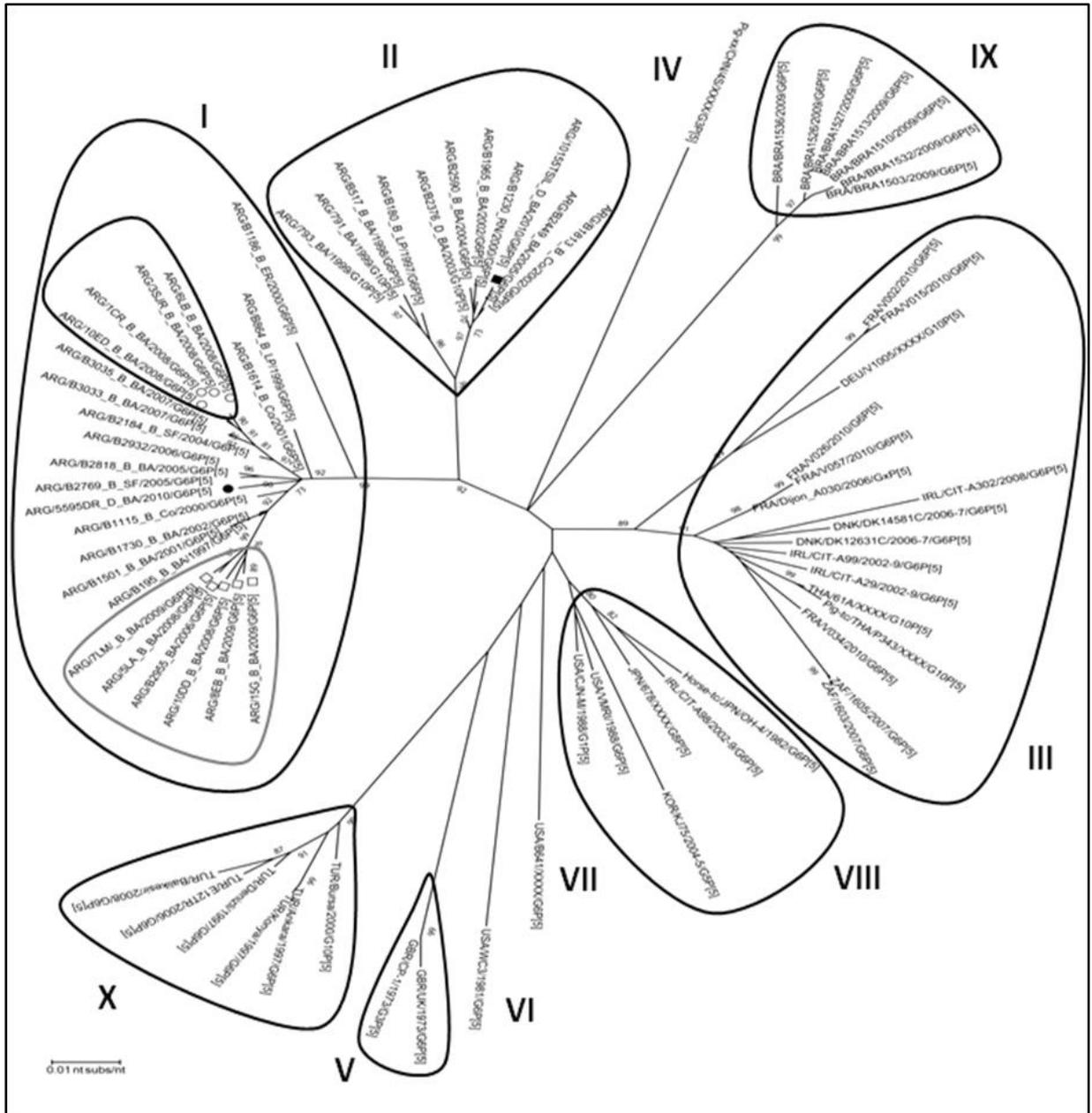


Fig. 15.2. Análisis filogenético del genotipo P[5] basado en la subunidad VP8*. El árbol fue inferido con secuencias nucleotídicas utilizando el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los linajes se delimitan con círculos de contorno negro y se representan con números romanos. Los círculos pequeños, en gris o negro, señalan los subgrupos de cepas P[5] según su origen en las zonas de cría bovina. Los nombres de las cepas se abreviaron para facilitar su visualización. Se indica la especie de origen para todas aquellas cepas que no son de origen bovino. En las cepas argentinas se incluyen los nombres, tipos de explotación, provincias y años de recolección. Símbolos: cuencas lecheras “Oeste” (●) y “Abasto Norte” (■); zonas de cría “Depresión de Laprida” (□) y “Cuenca del Salado” (○). Abreviaturas: D (tambo), B (cría), BA (Buenos Aires), SL (San Luis) y Ne (Neuquén).

Como se puede observar a partir de la topología del árbol (Fig. 15.2), quedaron definidos 10 linajes (I-X), aumentándose el número de linajes previamente propuesto (I-VIII) (Badaracco *et al.*, 2013b). Los linajes I y II estuvieron constituidos exclusivamente por cepas de nuestro país, como anteriormente se describió (Badaracco *et al.*, 2013b). Las cepas G6(IV)P[5] analizadas en esta investigación también quedaron incluidas en los linajes I y II. No obstante, las cepas de cría del linaje I formaron 2 subgrupos (Fig. 15.2), los cuales quedaron definidos por la ubicación geográfica de los campos de cría en la Cuenca del Salado y en la zona de la Depresión de Laprida. Este agrupamiento de las cepas en 2 subgrupos también coincide con el agrupamiento observado luego del análisis filogenético de VP7 para el genotipo G6 (Fig. 13.2). La distancia genética promedio entre los 2 subgrupos fue de 3,1% (3-3,3%).

La cepa de tambo 5595DR_D_BA, obtenida en la cuenca Oeste, agrupó con las cepas G6(IV)P[5] provenientes de rodeos de cría de diferentes provincias y años (Badaracco *et al.*, 2013b). Esta es la primera cepa de tambo que agrupa en el linaje I del genotipo P[5]. Con respecto al linaje II, el mismo incluyó cepas argentinas G6 y G10 de cría y tambo. La cepa 10155TSIL_D_BA, obtenida en la cuenca Abasto Norte, agrupó dentro de este linaje. Con respecto a otros linajes, las cepas bovinas G6P[5] de Europa (Alemania, Dinamarca, Francia e Irlanda) agruparon dentro del linaje III y la cepa de referencia UK (G6P[5]), utilizada en las vacunas de nuestro país, formó parte del linaje V. Los linajes IX y X quedaron constituidos sólo por cepas bovinas de Brasil y Turquía, respectivamente.

La inclusión de un mayor número de cepas, para el análisis filogenético de P[5], determinó que se volvieran a definir los linajes (Fig. 15.2), el punto de corte (Fig. 16.2) y las distancias genéticas intralínea o entrelinajes (Tabla 13.2). El gráfico de frecuencias para las distancias genéticas se realizó teniendo en cuenta la topología del árbol (incluyendo 10 linajes). En el mismo se definió un punto de corte aproximado del 5% (95% de similitud nucleotídica) (Fig. 16.2).

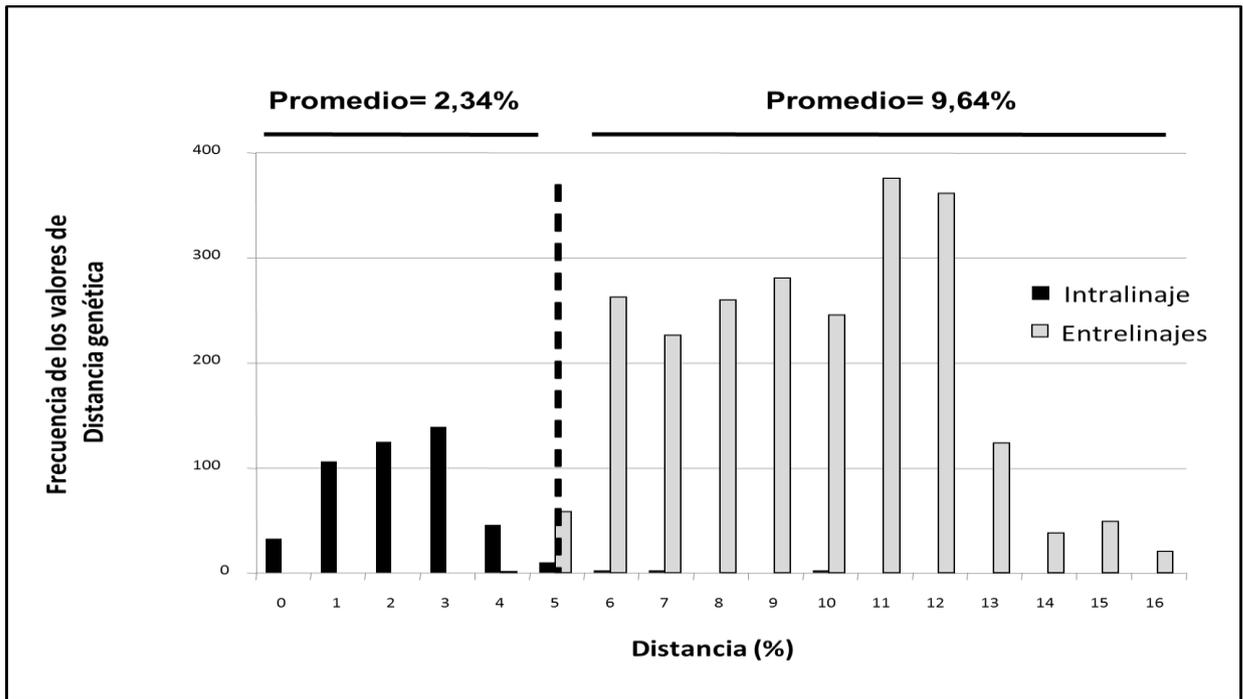


Fig. 16.2. Frecuencias de valores, expresados en porcentaje, para las distancias genéticas de a pares. Se indican los valores promedio para las distancias genéticas intralínea o entrelíneas. Los valores de las frecuencias se indican en el eje de las ordenadas (y) y los valores de las distancias en el eje de las abscisas (x). La línea de puntos representa el punto de corte, expresado como distancia genética, para diferenciar los linajes.

Tabla 13.2. Valores promedio, expresados en porcentaje, para las distancias genéticas intralínea y entrelíneas del genotipo P[5]

Linajes	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I	2,1									
II	5,8	1,9								
III	8,7	8,1	3,3							
IV	12,1	12,4	11	-						
V	11,7	11,8	10,5	14	6,7					
VI	10,1	9,3	7,4	13,3	12	3,3				
VII	9,5	9,9	10,5	13	10,3	10,3	-			
VIII	7,7	7,3	7,2	11,5	9,8	8,7	7,8	4,3		
IX	11,3	11,3	12,1	14,7	15,2	14,7	10,9	9,8	0,3	
X	12,2	11,3	10,5	14,3	11	11,9	12,8	11,2	15,2	1,3

3.5.7 Análisis de las secuencias de aminoácidos de VP8* para el genotipo P[5]

El alineamiento con las secuencias deducidas de aa de VP8* demostró que las cepas analizadas en el presente estudio tienen 17 prolinas y 1 cisteína, a diferencia de la cepa de referencia UK (G6(IV)P[5]) que tiene 18 prolinas conservadas. Los sitios antigénicos de la subunidad VP8* se denominan 8-1 (residuos en las posiciones 100, 146, 148, 150, 188, 190, 194), 8-2 (180 y 183), 8-3 (114, 116, 132, 133, 135, 136) y 8-4 (87, 88, 89) (Dormitzer *et al.*, 2002). La inspección del alineamiento de VP8* correspondiente al genotipo P[5] mostró que las cepas del presente estudio y de otro previo tuvieron pocas sustituciones (de 2 a 4) en los sitios antigénicos con respecto a la cepa de referencia UK, utilizada para elaborar las vacunas. Dichas sustituciones se ubicaron en los epitopes 8-1 (148 Val→Ile, 190 Phe→Ile), 8-2 (183 Asn→Asp), 8-3 (114 Pro→Ser) y 8-4 (88 Arg→Gly o Glu, 133 Val→Ala). Además, analizando toda la región codificante de VP8*, las cepas P[5] argentinas de ambos linajes (I y II) exhibieron 15 sustituciones aminoacídicas con respecto a la cepa UK. La mayoría de estas sustituciones también estuvieron presentes en las cepas P[5] de otras partes del mundo (Fig. 31.2, *Apéndice 1*).

3.5.8 Linajes correspondientes a las cepas del genotipo P[11]

El genotipo P[11] también es característico de las cepas bovinas y se encuentra asociado, principalmente, a los genotipos G6 y G10. Para este análisis filogenético se incluyeron 11 cepas bovinas de tambo ($n = 10$) y cría ($n = 1$) que fueron obtenidas durante la presente investigación. Estas cepas presentaron las combinaciones G6(III)P[11] (6 cepas), G8P[11] (1), G10P[11] (3) y G6(IV)+10P[11] (1). Además, se incluyeron otras cepas de bovino (70), conejo (1), humano (4) y jirafa (1), las cuales fueron descritas en diferentes países y están disponibles en la base de datos de GenBank.

Las relaciones filogenéticas entre las cepas se muestran en el dendrograma (Fig. 17.2) reconstruido con las secuencias nucleotídicas de VP8*. El análisis de las secuencias demostró que el genotipo P[11] es muy variable y sólo se pudieron establecer 3 linajes (I-III), quedando el resto de las cepas sin agrupar en ninguno de ellos. Los linajes II y III incluyeron sólo a cepas de Argentina y ambos linajes estuvieron soportados por altos valores *bootstrap*. La mayoría de las cepas de tambo, evaluadas en este estudio, agruparon dentro del linaje II y no mostraron ninguna relación entre ellas teniendo en cuenta la ubicación de los tambos. La primera cepa bovina G8P[11] de Argentina agrupó dentro del linaje III y mostró una estrecha relación con las cepas B1190_B_ER (G6P[11]) y B1625_B_BA (G6P[11]), ambas procedentes de campos de cría de Entre Ríos y Buenos Aires, respectivamente.

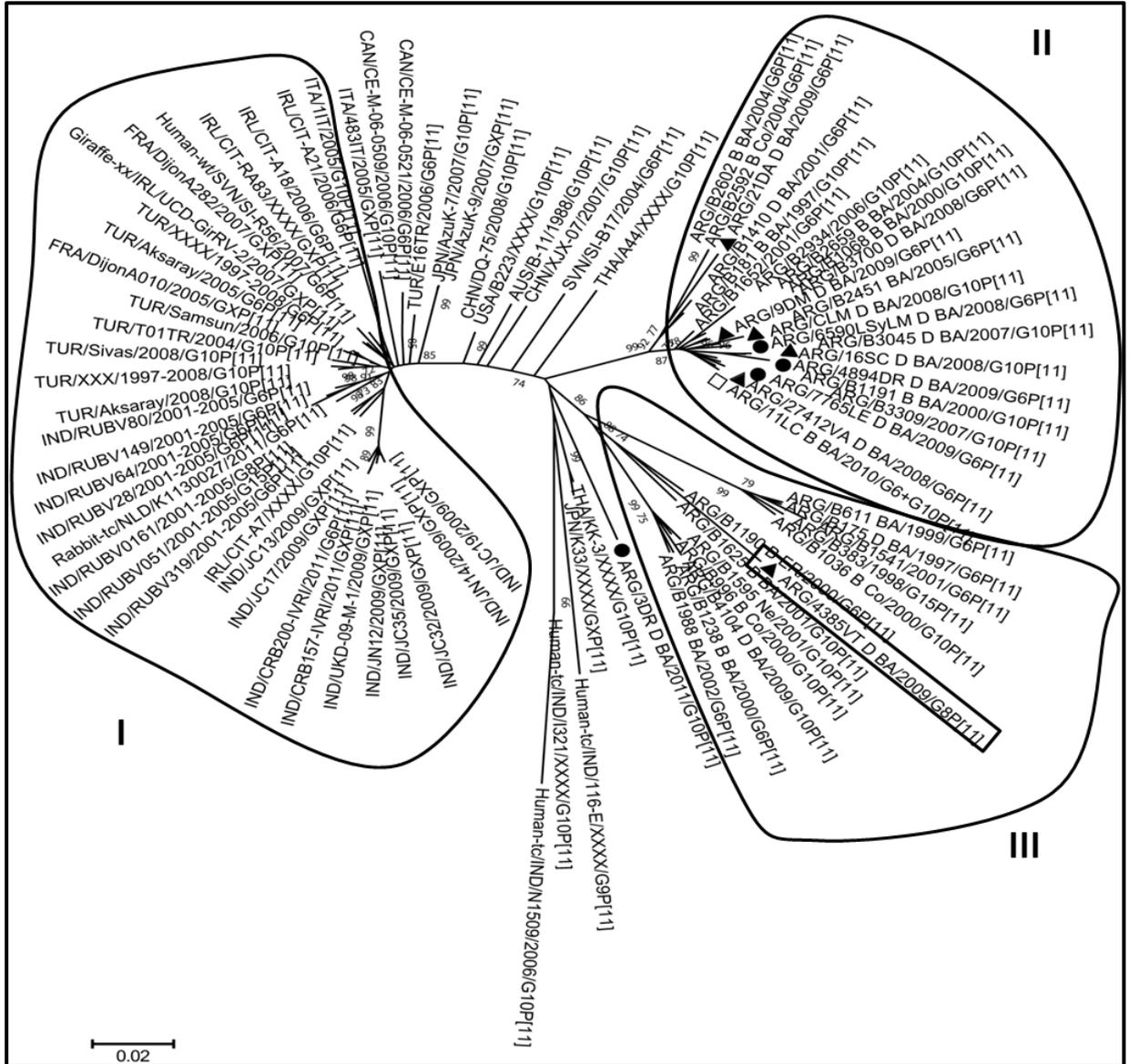


Fig. 17.2. Análisis filogenético del genotipo P[11] basado en secuencias nucleotídicas de la subunidad VP8*. El árbol fue reconstruido con el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (MEGA5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los linajes se indican con círculos de contorno negro y números romanos. Los nombres de las cepas se abreviaron para facilitar su visualización. Se indica la especie de origen para todas aquellas cepas que no son de origen bovino. En las cepas argentinas se indica nombre, tipo de explotación, provincia y año de recolección. Símbolos: cuencas lecheras “Mar y Sierras” (▲), “Oeste” (●) y zona de cría “Depresión de Laprida” (□). Abreviaturas: D (tambo), B (cría), BA (Buenos Aires), ER (Entre Ríos), Co (Córdoba) y Ne (Neuquén).

El linaje I quedó constituido por cepas bovinas P[11] de Francia, India, Irlanda, Italia y Turquía. Resulta interesante destacar que 2 cepas G6P[11] de tipo bovino (*bovine-like*), recuperadas a partir de un niño (G6SI-R56) y de una colonia de conejos (K1130027), agruparon dentro del linaje I. La cepa norteamericana de referencia B223 (G10P[11]), utilizada en las vacunas, no agrupó en ninguno de los 3 linajes propuestos.

Al incluirse un mayor número de cepas para el análisis filogenético, se volvieron a definir los linajes (Fig. 17.2), el punto de corte (Fig. 18.2) y las distancias genéticas intralínea o entrelinajes (Tabla 14.2). Para la confección del gráfico de frecuencias de las distancias genéticas (Fig. 18.2) sólo se tuvieron en cuenta los 3 linajes (I, II y III) observados en la topología del árbol filogenético. Algunas cepas mostraron distancias genéticas intralínea que fueron mayores a las distancias genéticas entrelinajes. Por ello, en el gráfico se puede apreciar un área (entre 7-11%) que tiene cierta superposición. El punto de corte aproximado fue del 8% (92% de similitud nucleotídica) (Fig. 18.2).

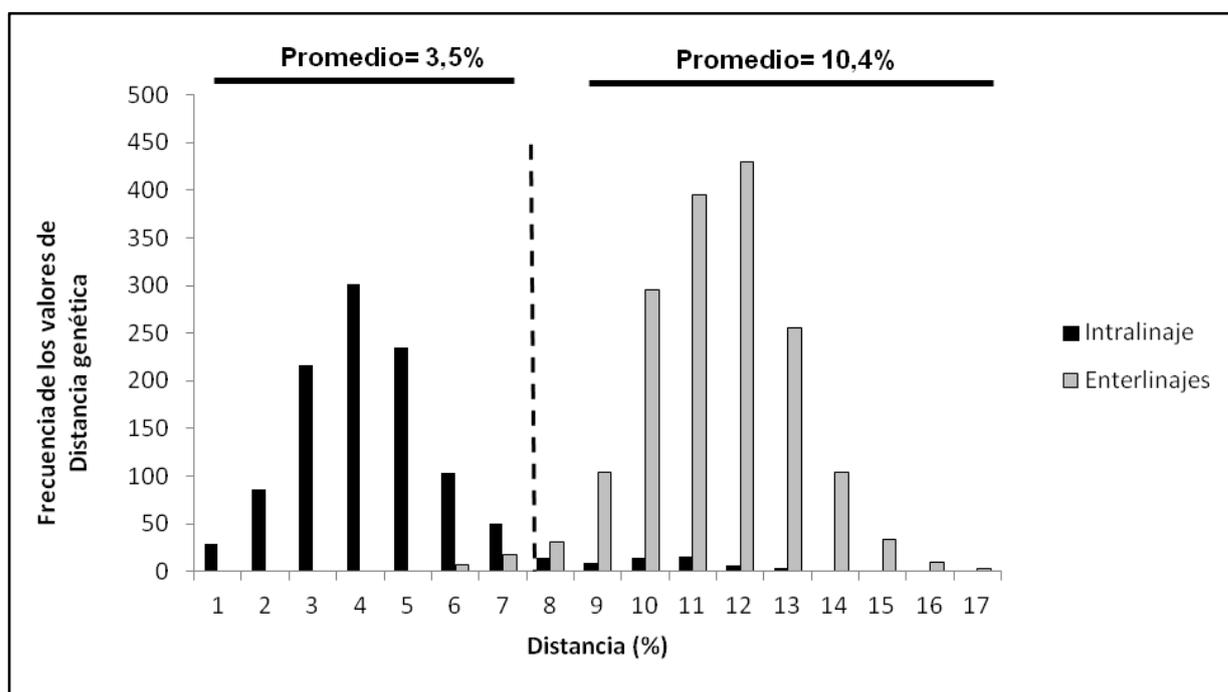


Fig. 18.2. Frecuencias de valores, expresados en porcentaje, para las distancias genéticas de a pares. Se indican los valores promedio para las distancias genéticas dentro de los linajes (intralínea) o entre los diferentes linajes (entrelíneas). Los valores de las frecuencias se indican en el eje de las ordenadas (y) y los valores de las distancias en el eje de las abscisas (x). La línea de puntos representa el punto de corte, expresado como distancia genética, para diferenciar los linajes.

Tabla 14.2. Valores promedio, expresados en porcentaje, para las distancias genéticas intralínea y entrelíneas del genotipo P[11]

Linajes	I	II	III
I	3		
II	9,6	3,2	
III	11,5	11,2	7,6

Dado que algunas cepas P[11] quedaron fuera de los linajes propuestos, se realizó el análisis filogenético del genotipo P[11] basado en las secuencias deducidas de aa para VP8*. La reconstrucción del árbol filogenético determinó la presencia de 3 linajes (I, II y III), soportados por altos valores de *bootstrap* como previamente se describió (Badaracco *et al.*, 2013b). El análisis con aa determinó que todas aquellas cepas que no agrupaban en ningún linaje, utilizando las secuencias de nt, pasaran a formar parte del linaje III (Fig. 27.2, *Apéndice 1*).

3.5.9 Análisis de las secuencias de aminoácidos de VP8* para el genotipo P[11]

El alineamiento de las secuencias de VP8* permitió comparar a las cepas bovinas G6P[11] y G10P[11] de Argentina con respecto a la cepa vacunal B223 y a otras cepas P[11], principalmente de bovinos (Fig. 32.2, *Apéndice 1*). En la inspección del alineamiento se observaron algunas diferencias. La cepa de referencia B223 presentó 12 prolinas, 1 cisteína y 2 sitios potenciales de escisión para la tripsina. En cambio, la mayoría de las cepas obtenidas en este estudio presentaron 13 prolinas (posición 78 para la prolina adicional), a excepción de las cepas 6590LSyLM_D_BA (G6(III)P[11]), 4894DR_D_BA (G6(III)P[11]), 3DR_D_BA (G10P[11]) y 4385 VT_D_BA (G8P[11]) que tuvieron 12 prolinas; además ninguna cepa presentó residuos de cisteína. En cuanto a las regiones antigénicas, la mayoría de las cepas no mostraron sustituciones, manteniéndose bastante conservadas con respecto a la cepa B223. Sin embargo, las cepas 9DM_D_BA (G6(III)P[11]) y 16SC_D_BA (G10P[11]) presentaron sustituciones de aa en las posiciones 148 (Thr→Ala) y 150 (Ala→Thr) del sitio antigénico 8-1, respectivamente.

Analizando toda la región codificante de VP8*, algunas cepas del linaje II (definido por secuencia de nt., Fig. 17.2) presentaron el mismo tipo de sustitución aminoácidica con respecto a la cepa B223 en las posiciones 123 (Asn→Gly), 167 (Arg→Lys) y 211 (Asp→Gly). Este hallazgo no pudo ser observado con las cepas de los linajes I y III o con aquellas cepas que no agruparon en ningún linaje (Fig. 32.2, *Apéndice 1*).

3.6 Estudios de patogenicidad de RVA con cepas autóctonas de tambo

Los terneros inoculados experimentalmente desarrollaron diarrea a las 60 hpi (G6(III)P[11]) y 40 hpi (G10P[11]), aproximadamente. Ambos terneros manifestaron anorexia al momento de la diarrea y el ternero desafiado con la cepa G6(III)P[11] mostró decaimiento el día anterior a la aparición de la misma. La detección de Ag coincidió con el inicio de la diarrea. La genotipificación de VP7 y los análisis de las secuencias de VP7 y VP8* confirmaron que los genotipos presentes en los “pooles” (MF y CI) de cada ternero se correspondían con los

genotipos de las cepas presentes en los inóculos. Los títulos de cada cepa en sus respectivos “pooles” fueron de $10^{5,52}$ UFF/ml (G6(III)P[11]) y $10^{4,82}$ UFF/ml (G10P[11]). Por su parte, la titulación por ELISA de cada pool resultó positiva hasta la dilución (-3).

Con respecto a las lesiones histológicas, en las porciones de yeyuno e íleon del ternero infectado con la cepa G6(III)P[11] se observó una atrofia (acortamiento) moderada de las vellosidades y pérdida de enterocitos superficiales en los extremos de las mismas (Fig. 19.2); ambas con una distribución multifocal. En el íleon se observaron enterocitos cuboidales y en ambas porciones de intestino delgado (yeyuno e íleon) se observó una inmunoreactividad fuerte, granular e intracitoplasmática frente a RVA en los enterocitos superficiales (IHQ, Fig. 20.2) y desprendidos. En la lámina propia del yeyuno, principalmente a nivel de las vellosidades, se apreció una enteritis mononuclear, difusa y moderada con predominio de macrófagos y ocasionales linfocitos. En el duodeno también se observó una enteritis mononuclear leve (macrófagos, células plasmáticas y leucocitos globulares) en el ápice de las vellosidades. En las distintas porciones del intestino delgado se observó una dilatación leve a moderada del quilífero central de las vellosidades. En el intestino grueso (ciego y colon) no se observaron lesiones.

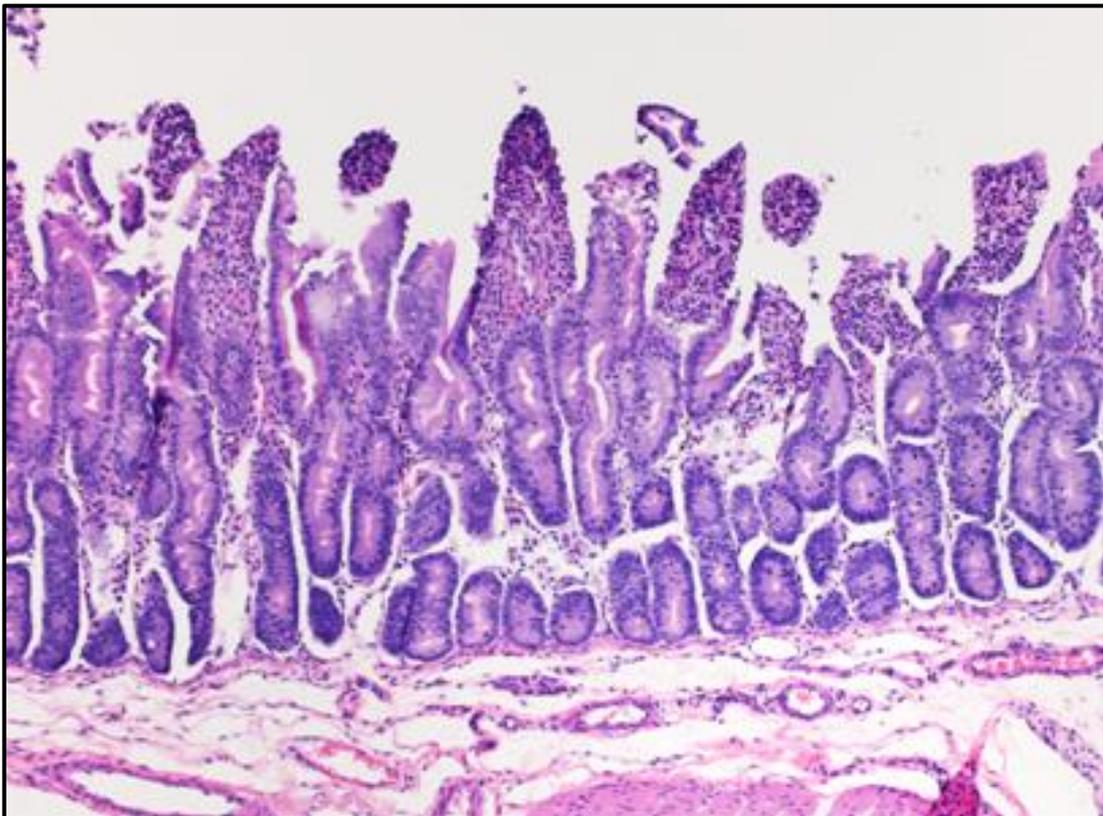


Fig.19.2. Sección histológica de yeyuno, ternero infectado con cepa de RVA genotipo G6(III)P[11]. Acortamiento de vellosidades y pérdida de enterocitos superficiales. HE, 10x.

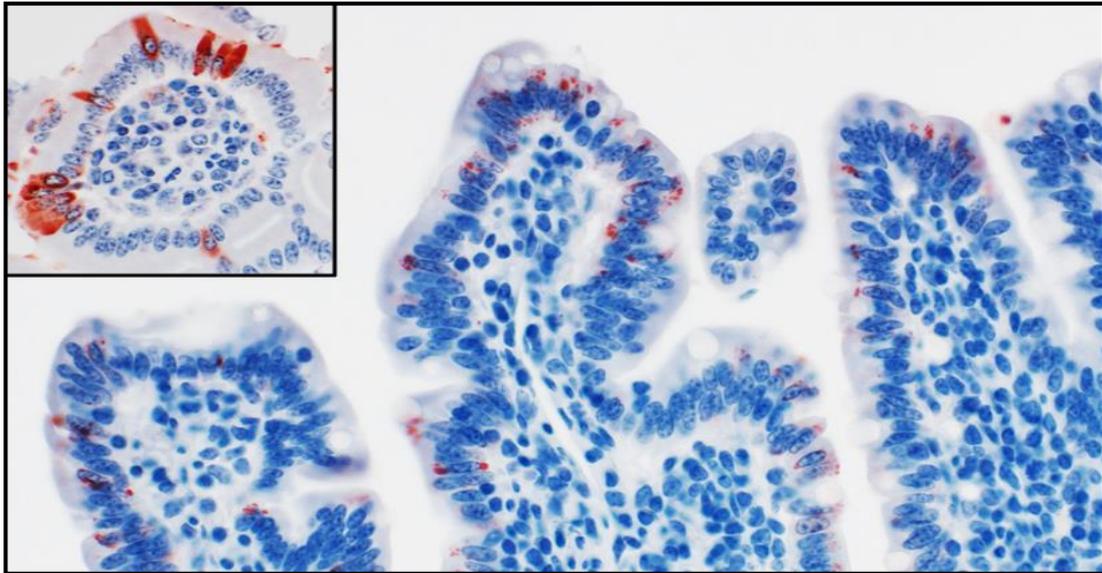


Fig. 20.2. Intestino delgado, ternero infectado con RVA genotipo G6(III)P[11]. Inmunoreactividad de tipo granular e intracitoplasmática, en los enterocitos apicales y laterales de las vellosidades. IHC, 40x.

Aunque el ternero infectado con la cepa G10P[11] no presentó lesiones microscópicas en la mucosa del intestino delgado, se observó una escasa presencia de Ag viral dentro del citoplasma de los enterocitos superficiales (IHQ, Fig. 21.2). En el yeyuno se apreció un infiltrado mononuclear muy leve y multifocal con predominio de macrófagos, linfocitos y ocasionales plasmocitos. En el íleon se observó dilatación focal de los quilíferos de las vellosidades y de los vasos linfáticos de la túnica muscular. En el ciego y colon no se observaron lesiones relevantes, a excepción un infiltrado mononuclear muy leve y focal en la muscular de la mucosa.

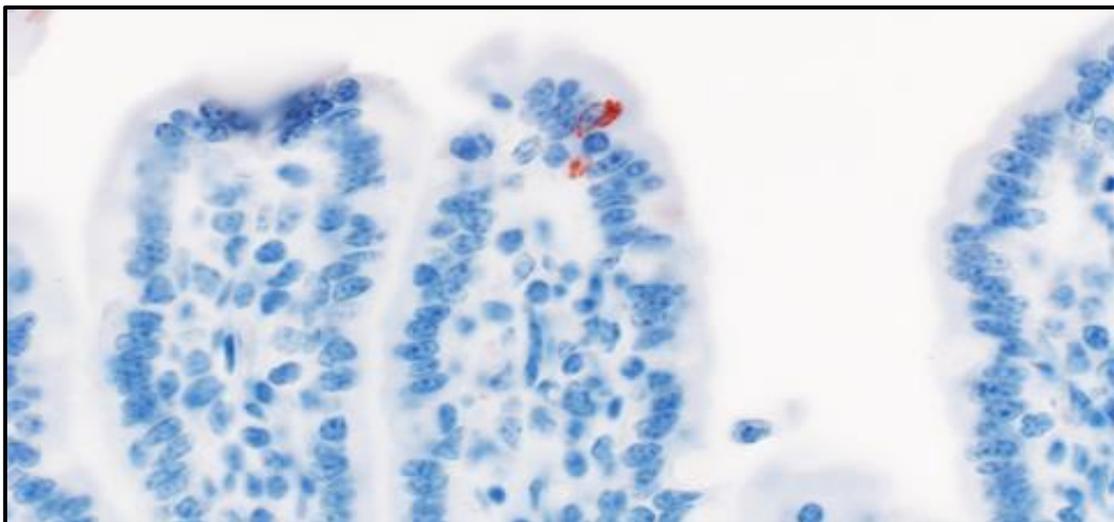


Fig. 21.2. Intestino delgado, ternero infectado con RVA genotipo G10P[11]. Inmunoreactividad ocasional, de tipo granular e intracitoplasmática, en los enterocitos apicales de las vellosidades. IHC, 40x.

3.7 Adaptación de RVA a cultivo celular

La cepa G6(III)P[11] se logró multiplicar hasta un 4 to. pasaje en cultivo de células MA-104 y se observó efecto citopático (Fig. 22.2). Esta cepa fue obtenida a partir de uno de los terneros descalostrados que fue inoculado experimentalmente y la misma demostró ser patógena. Lamentablemente, la cepa no pudo ser ampliada en los sucesivos pasajes. Los sobrenadantes de los cultivos celulares obtenidos en el 3er. y 4 to. pasaje fueron positivos a la detección de Ag de RVA por ELISA indirecto. Los análisis (RT-PCR y secuenciación) del sobrenadante y de las células recolectadas durante el 4 to. pasaje confirmaron el genotipo G6(III).

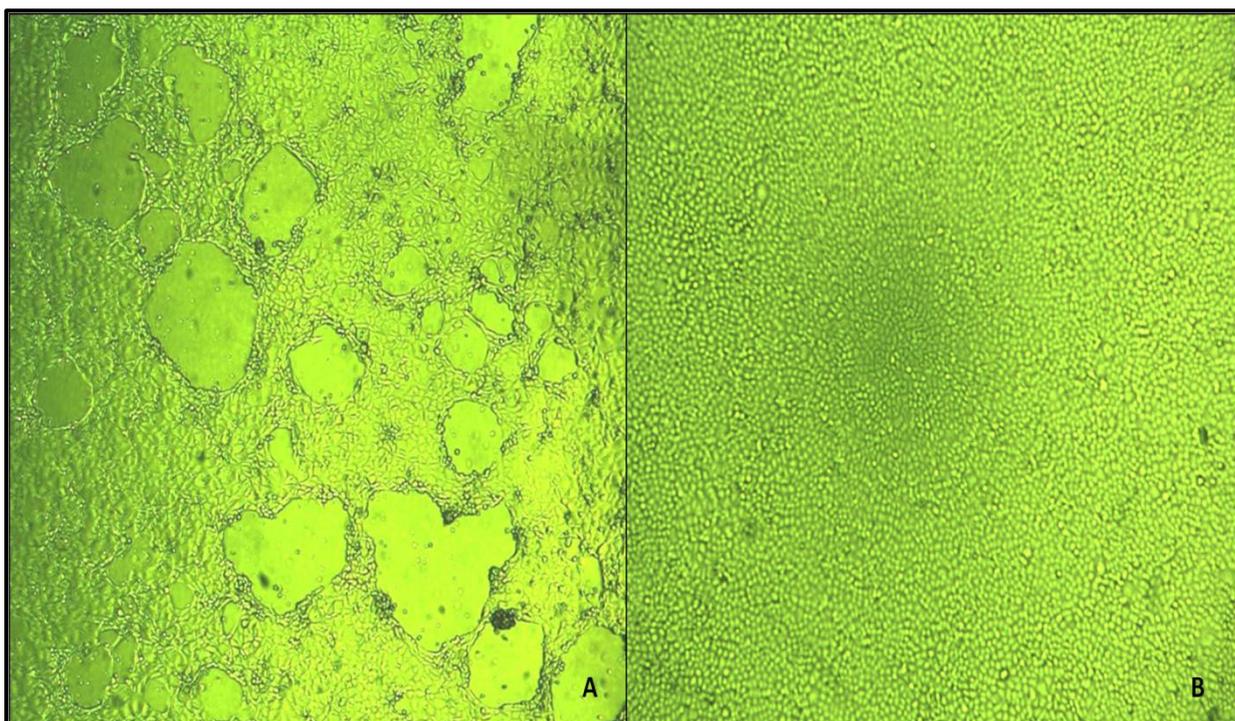


Fig. 22.2. Efecto citopático en una monocapa de células MA-104 infectadas con RVA genotipo G6(III)P[11]. Se observa redondeamiento, agrupamiento y desprendimiento de células y formación de focos de lisis, 40x (A). Monocapa de células MA-104 sin infectar, 40x (B).

4. Discusión

En el año 1980 se confirma, por primera vez en Argentina, el rol de RV como agente etiológico de la DNT (Zorati de Verona *et al.*, 1980). Actualmente, RVA es una de las principales causas de diarrea en terneros (Alkan *et al.*, 2010) y produce importantes pérdidas económicas (Swiatek *et al.*, 2010a) para la ganadería debido al aumento en la mortalidad, los costos en tratamientos y la reducción en la ganancia de peso (Reidy *et al.*, 2006; Papp *et al.*, 2013). Los estudios epidemiológicos realizados en Argentina (Bellinzoni *et al.*, 1990), Australia (Izzo *et al.*, 2011), España (de la Fuente *et al.*, 1998), Francia (Bendali *et al.*, 1999), Polonia (Kaba *et al.*, 2006), Reino Unido (Reynolds *et al.*, 1986) y Suiza (Lanz Uhde *et al.*, 2008) confirmaron que RVA es el principal agente etiológico implicado en los casos y brotes de DNT. El presente trabajo demostró que RVA tiene una amplia distribución, circulando en más del 80% de los establecimientos (cría para carne y tambos) ubicados en la provincia de Buenos Aires. Este hallazgo coincide con las investigaciones realizadas en el Reino Unido, en donde el 78% y 93% de los establecimientos presentaron terneros positivos a RV (Reynolds *et al.*, 1986; Snodgrass *et al.*, 1986).

La amplia distribución de RV en la población bovina obedece a distintas causas. Una de ellas es la persistencia prolongada del virus en el medio ambiente, ya que puede mantenerse estable por 9 meses a temperatura ambiente (Woode, 1978). También, es capaz de resistir a la inactivación por los desinfectantes de uso común (Cilli y Castrucci, 1981; Pastoret *et al.*, 1984) y el calor a 60 °C por 1 h (Woode, 1978). Por otra parte, si bien el virus tiene diferentes fuentes de infección, la MF del ternero con diarrea es la más importante (Pastoret *et al.*, 1984), ya que puede contener una gran cantidad de partículas virales ($10^{10}/g$) (Cilli y Castrucci, 1981). Los terneros de 6 semanas a 3 meses de vida también excretan el virus en forma subclínica (Pastoret *et al.*, 1984). En los bovinos adultos, algunos autores consideran que es poco probable que ocurra la excreción del virus en forma subclínica (Cilli y Castrucci, 1981; Pastoret *et al.*, 1984). No obstante ello, otros autores indican que las vacas adultas y sanas pueden eliminar el virus en las heces (Crouch y Acres, 1984; Pastoret *et al.*, 1984), siendo estas últimas una fuente de infección para los terneros recién nacidos (48 h de vida) (McNulty *et al.*, 1976; Pastoret *et al.*, 1984). Además, recientemente en Japón se describió un brote de diarrea en vacas lecheras, el cual se atribuyó a una cepa de RVA caracterizada como G15P[14] (Masuda *et al.*, 2014).

La primera descripción en el país de CoVB como causa de diarrea en terneros se hizo en el año 1979 (Zoratti de Verona, *et al.*, 1979). CoVB es un patógeno entérico primario (Boileau y

Kapil, 2010) aunque algunos autores lo consideran como un virus pneumoentérico (Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010), ya que tiene tropismo por el tracto digestivo y respiratorio (McNulty *et al.*, 1984; Reynolds *et al.*, 1985; Saif, 2008; Boileau y Kapil, 2010). Este virus es ubicuo en la población bovina de todo el mundo (Saif, 2008) y es considerado como una de las principales causas de diarrea (Gunn *et al.*, 2010; Izzo *et al.*, 2015). Durante la presente investigación se observó que la circulación de CoVB fue de menor importancia con respecto a RVA y estuvo limitada a los establecimientos lecheros. Los estudios epidemiológicos realizados en el Reino Unido (Reynolds *et al.*, 1986; Snodgrass *et al.*, 1986), España (de la Fuente *et al.*, 1998), Suiza (Lanz Uhde *et al.*, 2008) y Australia (Izzo *et al.*, 2011) también indican que las prevalencias de rodeos positivos a CoVB son menores que las obtenidas para RVA. Las prevalencias de rodeos o establecimientos positivos a CoVB en dichos estudios fueron superiores (41% y 56%) (Snodgrass *et al.*, 1986; Reynolds *et al.*, 1986), similares (20%) (Izzo *et al.*, 2011) o inferiores (2,1%) (Lanz Uhde *et al.*, 2008) a la obtenida en el presente estudio (16,7%). Este virus es menos estable que RV en el medio ambiente (Kapil *et al.*, 1990) y sólo puede mantenerse viable por 3 días en presencia de materia orgánica (Boileau y Kapil, 2010). Esta característica sólo podría explicar parcialmente estas observaciones.

En esta investigación se registraron diferencias significativas en la epidemiología de RVA y CoVB según el sistema productivo. RVA circuló tanto en campos de cría para carne como en tambos, mientras que la presencia de CoVB estuvo restringida a los tambos. Además, la frecuencia de infecciones por RVA fue mucho mayor que la registrada para CoVB. Esto mismo se observó en dos estudios realizados en el el Reino Unido. En ellos se encontró que las proporciones de infecciones por RVA (50% y 42%) fueron mayores a las observadas para CoVB (8% y 14%) (Snodgrass *et al.*, 1986; Reynolds *et al.*, 1986). En cambio, en EEUU se realizó un estudio en el cual se determinó que la tasa de detección de CoVB (34,6%) fue mayor que la de RVA (12,9%), tanto en los rodeos de carne como de leche (Bulgin *et al.*, 1982). En Canadá, mediante las técnicas de ME y ELISA, se registraron frecuencias de detección similares para CoVB (11%) y RVA (18,7%) (Athanasios *et al.*, 1994). Es posible que la importancia relativa de cada virus cambie en función de los sistemas productivos, el tipo de estudio, la latitud o condición climática y el país en particular.

La circulación de RVA en los establecimientos estudiados (provincia de Buenos Aires) también mostró diferencias según el sistema productivo. Existió una mayor proporción de terneros de cría para carne infectados con el virus en comparación con los terneros de tambo. Este hallazgo se observó tanto en animales diarreicos como en aquellos sin diarrea,

concluyéndose que los terneros de cría tuvieron un mayor riesgo de infección por RVA. Estas diferencias en el comportamiento epidemiológico del virus también se observaron en Argentina hace más de 15 años. En dicha oportunidad sólo se evaluaron terneros diarreicos y las infecciones por RVA, ya sea sólo o asociado a otros agentes, se presentaron en el 45,6% de los terneros de rodeos para carne y en el 23,8% de los terneros de tambo ($p < 0,01$) (Bellinzoni *et al.*, 1990). En este mismo sentido, un estudio realizado en 6 estados de Brasil también demostró una mayor frecuencia de infecciones por RVA en terneros diarreicos de rodeos para carne (22,8%) en comparación con aquellos de rodeos lecheros (16,4%) ($p = 0,0005$) (Alfieri *et al.*, 2006). Sin embargo, un estudio en EEUU reportó una menor tasa de detección de RVA en campos de cría (1,9%) con respecto a los tambos (6,7%) (Bulgin *et al.*, 1982), aunque no se determinó la causa de este hallazgo.

A partir de la información obtenida en nuestra región, y en concordancia con lo informado por otros autores (Woode, 1978, Bellinzoni *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 2004; Alfieri *et al.*, 2006), se confirma que la diarrea por RVA es un problema sanitario que tiene mayor impacto en los rodeos de cría para carne. Existen distintas explicaciones para esta diferencia epidemiológica. La infección por RV se disemina rápidamente y es particularmente severa en este tipo de rodeos (Woode, 1978), lo cual puede atribuirse a las prácticas de manejo. En los rodeos de carne, el servicio con toros suele tener una duración de 90-120 días. Esto determina una alta concentración de partos en un período de tiempo acotado. Como consecuencia de ello, se facilitarían la transmisión del virus entre los terneros de edad similar (Scott *et al.*, 2004; Alfieri *et al.*, 2006), ya que éstos tienden a congregarse y pueden estar en contacto directo con las heces y las ubres contaminadas de las madres (Woode, 1978). Además, al inicio de la temporada de parición, los terneros se exponen a un bajo desafío con diferentes agentes patógenos y desarrollan infecciones subclínicas. Sin embargo, estos animales se convierten en amplificadores biológicos, eliminando estos agentes en número mayor al necesario para infectarse. De esta manera, los terneros nacidos posteriormente en la temporada experimentan signos clínicos más severos, la incidencia de las enfermedades aumenta y la edad de los terneros enfermos disminuye (Larson y Tyler, 2005).

En la presente investigación se demostró una asociación significativa entre la detección de RVA y la presencia de diarrea en los terneros de ambos sistemas productivos. La proporción de terneros diarreicos positivos a RVA (25,6%) fue similar a la registrada previamente (33,4%) en Argentina (Bellinzoni *et al.*, 1990) y también coincide con lo hallado en Australia (30,6%) (Swiatek *et al.*, 2010a) y Suecia (22,6%) (de Verdier Klingenberg *et al.*, 1999). No obstante, en

nuestro país, hay estudios que indican prevalencias mayores para RVA en terneros con diarrea (42% y 53%) (Bellinzoni *et al.*, 1987; Garaicoechea *et al.*, 2006) a pesar de haberse utilizado la misma técnica de diagnóstico (ELISA). Es probable que las diferencias encontradas puedan deberse al tipo de muestreo, al momento en el cual se recolectaron las muestras en cada brote de DNT y a la edad de los terneros evaluados.

La prevalencia de RVA en terneros diarreicos también se ha estudiado en otras partes del mundo. Para ello se han utilizado técnicas basadas en la detección de Ag (ELISA e IC) o del genoma viral (RT-PCR, PCR en tiempo real y PAGE). Los estudios basados en ELISA e IC indicaron una alta prevalencia de RVA en Australia (48,7% y 30,6%) (Huang *et al.*, 1992; Swiatek *et al.*, 2010a), España (42,7%) (de la Fuente *et al.*, 1998; García *et al.*, 2000), Francia (49%) (Bendali *et al.*, 1999), Dinamarca (45,9%) (Midgley *et al.*, 2012a), Italia (37,1%) (Falcone *et al.*, 1999), Japón (37,8% y 36,7%) (Ishizaki *et al.*, 1996; Fukai *et al.*, 1999), Reino Unido (42% y 50,3%) (Reynolds *et al.*, 1986; Snodgrass *et al.*, 1986), Suecia (22,6%) (de Verdier Klingenberg *et al.*, 1999) y Suiza (58,7%) (Lanz Uhde *et al.*, 2008). No obstante, en algunos países se registraron valores de prevalencia menores, como ha ocurrido en Argelia (13,6%) (Akam *et al.*, 2011), Costa Rica (7%) (Pérez *et al.*, 1998), Méjico (10%) (Rodríguez Limas *et al.*, 2009) y Turquía (18,2%) (Ok *et al.*, 2009). En cuanto a los estudios de prevalencia de RVA basados en técnicas que detectan el genoma viral, los valores de prevalencia reportados fueron mayores o similares a los obtenidos por ELISA e IC. En Australia (Izzo *et al.*, 2011) y Francia (Kaplon *et al.*, 2013) se informaron prevalencias muy altas (79,9% y 60,4%) mediante las técnicas de RT-PCR y PCR en tiempo real, respectivamente (Izzo *et al.*, 2011; Kaplon *et al.*, 2013). En cambio, en Austria (21,1%) (Herrera-Luna *et al.*, 2009) y Brasil (19,4%) (Alfieri *et al.*, 2006) se hallaron prevalencias menores, aunque estos resultados se obtuvieron con las técnicas de RT-PCR y PAGE, respectivamente.

Las discrepancias en los valores de prevalencia para RVA que describen los diferentes estudios pueden tener varias explicaciones. Por un lado, se han utilizado distintas técnicas para detectar RVA, las cuales tienen mayor (RT-PCR) (Buesa *et al.*, 1996) o menor (PAGE) (Hammani *et al.*, 1990) sensibilidad que el ELISA. Además, existen numerosas variables de importancia que influyen en la incidencia de diarrea y por ende de los distintos agentes infecciosos asociados a la misma. Entre estas variables se incluyen la duración del estudio, el tipo de rodeo analizado (leche o carne), la región evaluada, la selección de muestras y rodeos (aleatorio o pre-seleccionado), el tamaño de muestra y la definición de caso (basado en tratamiento o en signos específicos) (Bendali *et al.*, 1999).

En Argentina, hasta el momento, no se ha evaluado la presencia de RVA en terneros de cría y tambo sin diarrea y en riesgo de exposición. El presente trabajo demostró que este virus puede ser detectado en forma subclínica en el 10% de los terneros de cría para carne y en menos del 5% de los terneros de tambo. Estos valores son mayores al 2,2% observado en un estudio realizado en EEUU. Sin embargo, en este último sólo se evaluaron establecimientos que no tenían antecedentes recientes de DNT (Myers *et al.*, 1984). Si bien la asociación entre la detección de RVA y la presencia de diarrea parece evidente, hay estudios que no han podido establecer dicha asociación de manera significativa. En Irán, se determinó que la tasa de infección por RVA en terneros diarreicos (26,9%) fue similar a la encontrada en terneros sin diarrea (17%) ($p > 0,05$) (Mayameei *et al.*, 2010). Además, en una región Francia, también se encontró que la incidencia de RVA en terneros diarreicos y sin diarrea fue similar para ambos grupos (49% vs. 45,8%, respectivamente) (Bendali *et al.*, 1999). Las infecciones subclínicas pueden deberse a la excreción del virus durante el período de incubación de la enfermedad o una vez finalizada la diarrea. Con respecto a esto último, en nuestro estudio hubo 2 terneros sin diarrea y positivos a RVA que habían sido tratados con antibióticos los días previos al muestreo. Es posible que, en dichos animales, la duración de la excreción viral haya sido mayor a la duración de la diarrea. Esto suele ocurrir cuando hay presencia de Ac pasivos en la luz intestinal, los cuales provienen del calostro o de la leche materna. Estos Ac disminuyen la severidad de la diarrea y acortan la duración de la excreción viral, la cual puede mantenerse en forma subclínica (Saif *et al.*, 1983; Parreño *et al.*, 2004). También, la edad del ternero al momento de la infección y la virulencia de las cepas son factores importantes. En condiciones experimentales, las cepas de baja virulencia pueden infectar terneros mayores a 7 días de vida sin causarles diarrea (Bridger *et al.*, 1994).

RVA tiene un sistema de clasificación binario en tipos G y P de acuerdo a las propiedades antigénicas o a las secuencias de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4, respectivamente (Estes y Kapikian, 2007). Los tipos G y P pueden determinarse por métodos serológicos o moleculares y de acuerdo al método utilizado se denominan serotipos o genotipos, respectivamente (Estes y Kapikian, 2007). Los métodos moleculares se basan en la amplificación de los fragmentos génicos de VP7 y VP4 (Estes y Kapikian, 2007). Para ello se utilizan oligonucleótidos específicos de genotipo y técnicas de RT-PCR anidado o semianidado y múltiple. Estos métodos son una herramienta epidemiológica de mucha utilidad (Gentsch *et al.*, 1996; Reidy *et al.*, 2006), ya que permiten una genotipificación rápida y completa (Reidy *et al.*, 2006; Monini *et al.*, 2008) de las cepas presentes en la MF o aisladas en cultivos celulares

(Falcone *et al.*, 1999; Alfieri *et al.*, 2004). Además, el genotipado presenta varias ventajas, entre ellas se destacan su buena correlación con los serotipos (fundamentalmente para las variantes de VP7), la detección simultánea de diferentes genotipos en una misma muestra, la alta sensibilidad (Falcone *et al.*, 1999) y la utilización de reactivos universales (Gouvea *et al.*, 1990; Parwani *et al.*, 1993), convirtiéndose en una solución frente a las dificultades de las técnicas serológicas (Falcone *et al.*, 1999). No obstante, el genotipado presenta algunas limitantes para detectar genotipos poco comunes o nuevos (Monini *et al.*, 2008), pero estas han sido resueltas mediante la secuenciación de los productos de RT-PCR.

En las poblaciones bovinas es muy importante realizar el monitoreo de la frecuencia en que circulan los diferentes tipos G y P de RVA (Monini *et al.*, 2008; Rodríguez Limas *et al.*, 2009; Alkan *et al.*, 2010) y ello forma parte de la epidemiología molecular (de Verdier Klingenberg *et al.*, 1999). Su importancia radica en varios aspectos. Por un lado, aporta datos epidemiológicos para las infecciones en humanos y animales (Fukai *et al.*, 1999; Alfieri *et al.*, 2004), brinda conocimientos acerca de la ecología del virus (Desselberger *et al.*, 2001; Monini *et al.*, 2008; Alkan *et al.*, 2010) y su transmisión entre especies o la adaptación a nuevos hospedadores (Desselberger *et al.*, 2001; Monini *et al.*, 2008), facilita el hallazgo de cepas emergentes (Van der Heide *et al.*, 2005; Monini *et al.*, 2008; Alkan *et al.*, 2010) y de infecciones zoonóticas (Lucchelli *et al.*, 1994). Por otra parte, contribuye al desarrollo de vacunas (Lucchelli *et al.*, 1994; Fukai *et al.*, 1999; de Verdier Klingenberg *et al.*, 1999; Alfieri *et al.*, 2004; Rodríguez Limas *et al.*, 2009) o candidatos vacunales (Alfieri *et al.*, 2004), así como también permite evaluar su calidad (Falcone *et al.*, 1999) y efectividad (Lucchelli *et al.*, 1994; Rodríguez Limas *et al.*, 2009).

En el presente estudio se caracterizaron los genotipos G y P en la mayoría de las muestras (91% y 100%, respectivamente), lográndose una genotipificación completa (combinación de tipos G y P) de la mayoría (91%) de las mismas. Esta eficiencia para realizar la genotipificación completa fue similar a la informada por otros autores en distintos países, quienes reportan valores del 87,8% (Fukai *et al.*, 1999), 88% (Alfieri *et al.*, 2004), 90,1% (Monini *et al.*, 2008), 92,6% (Falcone *et al.*, 1999), 96,8% (Reidy *et al.*, 2006), 99,2% (Okada *et al.*, 2002) y 100% (Gulati *et al.*, 1996; Rodríguez-Limas *et al.*, 2009; Alkan *et al.*, 2010). La mayor eficiencia para caracterizar los genotipos P con respecto a los genotipos G también ha sido informada por otros autores (Falcone *et al.*, 1999; Alfieri *et al.*, 2004; Reidy *et al.*, 2006; Swiatek *et al.*, 2010a). En aquellas muestras que no se caracterizó el genotipo G (G?), tampoco se pudo obtener un producto de RT-PCR en la primera ronda de amplificación de VP7. Por lo tanto, se descarta una

falta de hibridación de los oligonucleótidos utilizados para la segunda ronda de PCR (genotipificación).

La mayoría de las muestras analizadas en este trabajo fueron caracterizadas como G6, G10, P[5] y P[11], todos genotipos propios de las cepas bovinas (Cook *et al.*, 2004). Este hallazgo coincide con lo observado en estudios previos realizados en Argentina (Garaicoechea *et al.*, 2006), Australia (Swiatek *et al.*, 2010a), Brasil (Alfieri *et al.*, 2004), India (Gulati *et al.*, 1999), Italia (Falcone *et al.*, 1999), Irlanda (Reidy *et al.*, 2006), Japón (Ishizaki *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 2002), Méjico (Rodríguez-Limas *et al.*, 2009) y Turquía (Alkan *et al.*, 2010). Sin embargo, en el presente estudio se detectó el genotipo G8, el cual es considerado como el tercero en importancia luego de G6 y G10. Además, en Argentina también se ha demostrado la presencia del genotipo G1 en una cepa bovina, cuya especificidad fue confirmada serológicamente y por secuenciación del gen codificante para VP7 (Blackhall *et al.*, 1992).

En esta investigación se evaluó la circulación de los genotipos G y P en dos sistemas de producción diferentes (tambo y cría para carne). En ambos sistemas se observó un predominio del genotipo G6, tanto en infecciones simples como mixtas, aunque la importancia relativa de las cepas G6 fue más evidente en los campos de cría. El genotipo G6 es el más frecuente en las cepas de RVA bovinas de todo el mundo y el porcentaje de detección en nuestro estudio (89,5%) fue mayor al encontrado en Japón (60-70% de las muestras) (Ishizaki *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 2002), Brasil (68%) (Alfieri *et al.*, 2004), Holanda (78,6%) (Van der Heide *et al.*, 2005), Turquía (72%) (Alkan *et al.*, 2010), Italia (78,5%) (Monini *et al.*, 2008) e Irlanda (80,6%) (Reidy *et al.*, 2006). Con respecto a los linajes de G6, existe un sólo estudio realizado en Argentina (Badaracco *et al.*, 2012) que evaluó epidemiológicamente estos linajes utilizando la técnica de RT-PCR semi-anidada y múltiple. En el presente estudio se confirmó y demostró una diferencia aún mayor en la distribución de los linajes de G6 según el sistema productivo, predominando G6(IV) en cría y G6(III) en tambo. En el resto del mundo existen muy pocas investigaciones que caracterizaron los linajes de G6 en muestras de campo y para ello utilizaron RT-PCR y secuenciación de VP7. En Holanda, las cepas G6 circulantes pertenecieron a los linajes G6(III) (17,9%), G6(IV) (42,9%) y G6(V) (32,1%) (Van der Heide *et al.*, 2005). Asimismo, en Irlanda se han encontrado cepas bovinas G6 que agruparon en los linajes G6(III) (2 cepas), G6(IV) (5 cepas) y G6(V) (3 cepas) (Cashman *et al.*, 2010). Por otra parte, en Eslovenia se caracterizó el genoma completo de una cepa bovina (SI-B17) que correspondió al linaje G6(III) (Steyer *et al.*, 2013). Más recientemente, en Francia, se identificaron cepas G6(IV) en terneros diarreicos, tanto de rodeos vacunados como en aquellos sin vacunar (Kaplun *et al.*, 2013). En

Argentina, hasta el momento, nunca se han detectado cepas bovinas que pertenezcan a los linajes G6(I), G6(II) y G6(V) (Garaicoechea *et al.*, 2006; Louge Uriarte *et al.*, 2011; Badaracco *et al.*, 2012).

Con respecto al genotipo G10, su frecuencia de detección fue menor que la de G6 y estuvo restringida, casi exclusivamente, al sistema tambo. Este hallazgo coincide con lo reportado previamente en nuestro país (Garaicoechea *et al.*, 2006). En tambo, la frecuencia de infecciones simples por G10 (4,5%) fue similar a la descrita en Australia (7,7%) (Swiatek *et al.*, 2010a), Irlanda (9,7%) (Reidy *et al.*, 2006) e Italia (9,9%) (Monini *et al.*, 2008). En general, a nivel mundial son muy pocos los países que muestran una alta prevalencia de cepas G10 y entre ellos se incluyen India (67% y 83%) (Gulati *et al.*, 1999; Varshney *et al.*, 2002) y México (75%) (Rodríguez-Limas *et al.*, 2009). Más recientemente, un trabajo en Argentina no encontró diferencias en la distribución de G10 según el sistema productivo, ya que se observaron muchas infecciones mixtas por G10 en campos de cría (Badaracco *et al.*, 2012).

En este estudio, un ternero de tambo presentó una infección por una cepa de RVA correspondiente al genotipo G8, la cual estuvo asociada a una infección por CoVB. Este hallazgo constituye el primer reporte en Argentina de una infección simple por el genotipo G8. En nuestro país, hasta el momento, sólo se habían registrado dos infecciones mixtas (G6(III)+G8) en terneros procedentes de dos tambos de la provincia de Buenos Aires (Badaracco *et al.*, 2012). Sin embargo, la detección de una cepa bovina G8 no resulta inesperada en vista de lo encontrado en otras especies de animales de Argentina. En un cerdo de 45 días de vida y sin diarrea se identificó una cepa G8P[6] (Parra *et al.*, 2008). Por otra parte, se han detectado cepas G8P[1] (ARG/Rio_Negro/1998) y G8P[14] (ARG/Chubut/1999) en guanacos nativos de Rio Negro y Chubut (Matthijssens *et al.*, 2009), así como también cepas G8P[14] (ARG/75/2010) y G8PX (ARG/C69/2010) aisladas de vicuñas menores a 1 año de vida y sin diarrea, criadas en la Puna Andina de Jujuy (Badaracco *et al.*, 2013a). Recientemente, también se demostró por primera vez en Argentina la presencia de cepas G8 en cabras de la provincia de Buenos Aires (Louge Uriarte *et al.*, 2014).

La circulación del genotipo G8 en bovinos es mucho menos frecuente si se compara con G6 y G10 (Parwani *et al.*, 1993; Fukai *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 2002; Monini *et al.*, 2008) y además, en muchos países no se ha podido detectar este genotipo (Gulati *et al.*, 1999; Falcone *et al.*, 1999; Reidy *et al.*, 2006; Rodríguez-Limas *et al.*, 2009; Alkan *et al.*, 2010; Swiatek *et al.*, 2010a). Algunos estudios reportaron una prevalencia muy baja de cepas G8, como por ejemplo en Escocia (0,6%) (Snodgrass *et al.*, 1990), EEUU (2,9%) (Parwani *et al.*, 1993), Japón (1,4%)

(Okada *et al.*, 2002), India (5,8%) (Varshney *et al.*, 2002) e Italia (4,7%) (Monini *et al.*, 2008). Estos resultados son coincidentes con nuestro estudio y son evidencias claras de la participación esporádica del genotipo G8 en las infecciones por RVA en terneros. A pesar de ello, existen excepciones como lo ocurrido en Japón, donde se demostró por primera vez una elevada prevalencia del genotipo G8 (60,6%) en terneros de carne con diarrea y muchas infecciones (33%) fueron mixtas (G8P[1+11]) (Fukai *et al.*, 1999). Aunque otros trabajos también describen la circulación de cepas G8 con prevalencias del 3-6% (Verdier Klingenberg *et al.*, 1999; Alfieri *et al.*, 2004), dichos resultados no fueron confirmados por secuenciación de VP7. Esto último sería un aspecto a tener en cuenta ya que el oligonucleótido DT6 (Gouvea *et al.*, 1994b), comúnmente utilizado en los protocolos de tipificación por PCR, puede dar resultados falsos positivos debido a un *mistyping* que se produce con las cepas G6(III), las cuales son clasificadas incorrectamente como G8 (Garaicoechea *et al.*, 2006; Cashman *et al.*, 2010).

Con respecto a los genotipos P, este estudio confirmó que la distribución relativa de P[5] y P[11] también varía de acuerdo al sistema productivo. Existió un predominio de P[5] en las muestras obtenidas en campos de cría y de P[11] en las de tambo, siendo este hallazgo muy consistente. En Argentina, una tendencia similar fue informada previamente (Garaicoechea *et al.*, 2006) y también en un estudio más reciente (Badaracco *et al.*, 2012). Analizando los sistemas productivos en forma conjunta, la frecuencia de detección de P[5] (58,2%) fue similar a la hallada en Australia (50%) (Swiatek *et al.*, 2010a), Brasil (66%) (Alfieri *et al.*, 2004) y Japón (45,7% y 67%) (Ishizaki *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 2002). Con respecto a P[11], la frecuencia de detección (37,3%) fue semejante a la encontrada en Japón (30% y 40,8%) (Fukai *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 2002). Sin embargo, existen países como India en donde el genotipo P[11] es claramente predominante (94% de las muestras) (Gulati *et al.*, 1999) y este hecho no parece depender del sistema de producción. En ninguna muestra se detectó el genotipo P[1], lo cual es coincidente con lo hallado en Argentina (Garaicoechea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012) y otros países como Australia (Swiatek *et al.*, 2010a), Italia (Falcone *et al.*, 1999; Monini *et al.*, 2008), Turquía (Alkan *et al.*, 2010) y Japón (Ishizaki *et al.*, 1996).

La diversidad de RVA bovino se limita a un número reducido de genotipos (Van der Heide *et al.*, 2005), lo cual se ve reflejado en una segregación preferencial de G6 con P[5] y de G10 con P[11] (Falcone *et al.*, 1999; Monini *et al.*, 2008). Las combinaciones G10P[5] y G8P[5] ocurren con mucha menor frecuencia (Monini *et al.*, 2008). Sin embargo, la reasociación puede ser la base para una mayor diversidad genética (Papp *et al.*, 2013) cuando las cepas presentan combinaciones de genotipos G y P diferentes (Gouvea y Brantly, 1995; Papp *et al.*, 2013). Bajo

condiciones naturales, las infecciones mixtas constituyen un mecanismo por el cual se facilita dicha reasociación genética (Gouvea y Brantly, 1995).

En la presente investigación se evaluó la diversidad genética de RVA a partir de la frecuencia relativa de los diferentes genotipos (G y P) y de la ocurrencia de infecciones mixtas. Se demostró una clara diferencia en la frecuencia y diversidad de genotipos G y P de acuerdo al sistema productivo. En el sistema de cría, la combinación G6(IV)P[5] fue claramente predominante y coincide con lo hallado previamente en Argentina (Bellinzoni *et al.*, 1999; Garaicochea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012). En cambio, las infecciones mixtas fueron muy poco frecuentes, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por otros autores en nuestro país, quienes indican una frecuencia similar en cría y tambo (Garaicochea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012). En el sistema de tambo predominó G6(III)P[11] y este hallazgo coincide con un estudio previo (Garaicochea *et al.*, 2006). Además, las infecciones mixtas fueron muy frecuentes y la mayoría de ellas estuvieron representadas por las combinaciones G6(III)+G10 y G6(IV)+G10. Otros estudios también indican que las infecciones mixtas por G6+G10 se presentan con una frecuencia similar, tal como se demostró en Australia (11,5%) (Swiatek *et al.*, 2010a), India (11%) (Gulati *et al.*, 1999) e Irlanda (9,9% y 13%) (Reidy *et al.*, 2006; Cashman *et al.*, 2010).

Hasta el momento, en nuestro país, se desconoce cuáles son las causas que determinan un comportamiento epidemiológico diferente para los genotipos G y P de RVA en función del sistema productivo. Es posible que las diferencias en el manejo y las razas bovinas, así como también el escaso intercambio de animales entre establecimientos de cría y tambos, puedan explicar este fenómeno biológico. En Argentina, los rodeos de cría se manejan en forma extensiva con una época de parición anual durante el invierno. Por lo tanto, sólo aquellas cepas con elevada infectividad y excretadas en un título elevado podrían ser capaces de infectar a un huésped susceptible en el próximo año. Las cepas G6(IV)P[5] parecen tener estas características (Garaicochea *et al.*, 2006) y además, circularían en forma subclínica en bovinos adultos durante un período prolongado (Badaracco *et al.*, 2012). La falta de terneros susceptibles a lo largo de todo el año ("*cuello de botella*"), como ocurre en los campos de cría, también podría explicar la menor diversidad genética de RVA en los rodeos de carne (Badaracco *et al.*, 2012). En cambio, en el sistema de tambo los terneros nacen a lo largo de todo el año y esto permite que haya una disponibilidad continua de animales susceptibles. Estos últimos favorecerían la circulación de aquellas cepas con menor aptitud, haciendo posible que se mantenga una mayor diversidad de genotipos (Garaicochea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012).

Lamentablemente, si bien los estudios realizados en otros países han evaluado los genotipos G y P en rodeos lecheros y de carne (Alfieri *et al.*, 2004; Falcone *et al.*, 1999; Monini *et al.*, 2008; Swiatek *et al.*, 2010a; Rodríguez-Limas *et al.*, 2009; Ishizaki *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 2002), ninguno de ellos indica que existan diferencias en la distribución relativa de los genotipos. Es posible que no se hayan encontrado diferencias o también que no se haya considerado al sistema productivo como una variable para analizar. Sólo dos países indican una variación en la distribución de los tipos G y P en función del rodeo. En Suecia, todas las cepas obtenidas en rodeos de carne pertenecieron al genotipo G6, mientras que las cepas de tambo fueron caracterizadas como G10 (54%) y en menor proporción G6 (32%) (de Verdier Klingenberg *et al.*, 1999). En el otro estudio, realizado en EEUU (Dakota del Sur), el genotipo G6 mostró una mayor prevalencia en las muestras de rodeos de carne en comparación con aquellas de rodeos lecheros (67% vs. 47,5%). En cambio, en los tambos predominaron G10 (17,5% vs. 5,5%) y las infecciones mixtas (G6+G10) (10%) o las muestras sin tipificar (G?) (25%) (Lucchelli *et al.*, 1994).

En Argentina, las vacunas para prevenir la DNT están formuladas con las cepas UK o Indiana (G6(IV)P[5]), las cuales pueden estar combinadas con la cepa B223 (G10 P[11]). Según la información disponible, el 78% de los establecimientos de cría que fueron evaluados aplicaban vacunas para prevenir la DNT. Sin embargo, esta práctica preventiva no modificó la distribución relativa de los genotipos, ya que G6(IV)P[5] predominó en todos los campos de cría. Esto coincide con lo hallado recientemente en Francia. Allí, un estudio demostró que G6(IV)P[5] fue el genotipo predominante, tanto en los rodeos vacunados (76,2%) como en aquellos sin vacunar (85,7%) (Kaplon *et al.*, 2013). Por lo tanto, y según los resultados obtenidos, es posible especular con que la vacunación no ejercería una presión selectiva que modifique los genotipos circulantes en nuestros rodeos de cría.

La variación temporal de los genotipos G y P que circulan dentro de un mismo establecimiento no ha sido evaluada en Argentina ni en la mayoría de los países, a excepción de Italia (Martella *et al.*, 2003) y Turquía (Alkan *et al.*, 2012). Con estos antecedentes, se decidió realizar la caracterización genética de las cepas de RVA obtenidas en el tambo “DR” durante los brotes de DNT ocurridos en 2009, 2010 y 2011. En dicho estudio se demostró que sólo una combinación de genotipos G y P predominó en cada muestreo. La combinación G6(III)P[11] prevaleció en el muestreo de 2009, G6(IV)P[5] durante el muestro de 2010 y G10P[11] en el muestro de 2011. Estos resultados fueron confirmados por análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de VP7 y VP8*. Si bien este hallazgo es novedoso y contribuye a la diversidad de

RVA, no resulta inesperado ya que hay una gran diversidad genética en las cepas de RVA que circulan en tambo. Por otra parte, tampoco se puede descartar la posibilidad de que existiera co-circulación de todos los genotipos durante el mismo año o incluso en el mismo brote de DNT. Nuestro estudio fue de tipo transversal (un muestreo por año) y en cada muestreo no se evaluaron todos los terneros expuestos. Además, la co-circulación de diferentes genotipos en un mismo brote de DNT ha sido descripta en nuestro país (Garaicoechea *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2012).

Algunas investigaciones describen una variación temporal en los genotipos de RVA. En un establecimiento de Italia hubo un reemplazo secuencial de los tipos antigénicos que circularon (Martella *et al.*, 2003) y en Irlanda se observaron fluctuaciones de los genotipos predominantes a lo largo de los años (2002-2009) (Cashman *et al.*, 2010). En este último estudio, el genotipo G6 representó el 77,7% de las muestras en 2004, luego disminuyó al 59,3% en 2005 y subió al 72,7% en 2009. Estas fluctuaciones estuvieron acompañadas por cambios en la frecuencia de G10, que en 2004 representó el 9,4% de las muestras, en 2005 el 16% y en 2009 el 25%. Esta tendencia estuvo acompañada por los cambios respectivos de los tipos P. La detección de P[5] fue del 77,8% en 2004, 25,9% en 2005 y 40,9% en 2009. Estas fluctuaciones se correspondieron con las variaciones de P[11], las cuales fueron de 9,3% en 2004, 38,3% en 2005 y 31,8% en 2009 (Cashman *et al.*, 2010). Las fluctuaciones temporales de los genotipos no parecen ser un fenómeno exclusivo de los sistemas de producción bovina. En un criadero de cerdos en Japón, se encontraron variaciones en los genotipos predominantes durante 4 brotes sucesivos de diarrea (desde Febrero 2009 a Marzo 2010). En el primer brote predominó G9P[23], en el segundo brote G9P[13]/[22], en el tercero G3P[7] y en el cuarto hubo diferentes combinaciones, entre ellas G9P[23], G5P[13]/[22] y G26P[7]. Estos hallazgos demuestran que puede existir una gran diversidad genética entre las cepas que circulan a lo largo del año en una misma granja (Miyazaki *et al.*, 2011).

Los análisis filogenéticos de VP7 y VP8* permitieron realizar un estudio más profundo de la relación genética entre las cepas de RVA que fueron obtenidas en distintas regiones y sistemas productivos. El análisis filogenético de VP7 correspondiente a la primera cepa bovina G8 de Argentina (4385VT_D_BA, G8P[11]) indicó que la misma tiene una íntima relación genética con la cepa 0040 (G8P[1]). La estrecha relación entre ambas cepas también se vio reflejada en la elevada similitud de sus secuencias de nt y aa. La cepa 0040 fue descripta recientemente en un tambo de cabras de la provincia de Buenos Aires (Louge Uriarte *et al.*, 2014). Si bien estas cepas fueron obtenidas de distintas especies de animales (bovino y cabra), resulta interesante que

ambas procedían de establecimientos ubicados en dos partidos limítrofes (Mar Chiquita y Gral. Pueyrredón). Además, las cepas 4385VT_D_BA y 0040 mostraron una relación filogenética muy próxima con otras cepas G8 de Argentina, las cuales fueron obtenidas de vicuñas (75/2010, G8P[14]) (Badaracco *et al.*, 2013a) y de guanacos (Chubut/1999/G8P[14]; Rio_Negro/1998/G8P[1]) (Matthijssens *et al.*, 2006). Todas las cepas G8 argentinas formaron un subgrupo dentro del linaje III, lo cual indica que existe una relación genética muy próxima para el gen codificante de VP7, independientemente de la especie de origen.

Luego del análisis filogenético de VP7 y VP8*, las cepas G6(IV)P[5] obtenidas en campos de cría agruparon formando dos subgrupos. Estos subgrupos quedaron definidos por la región productiva donde se ubicaron los establecimientos. Además, las diferencias entre los dos subgrupos se vieron reflejadas no sólo a nivel de nt, sino también en sus secuencias deducidas de aa. Todas las cepas correspondientes a la Depresión de Laprida presentaron diferencias en las secuencias deducidas de aa para VP7 y VP8* con respecto a las cepas de la Cuenca del Salado. Este resultado refuerza aún más el agrupamiento de las cepas según la ubicación de los campos de cría. Si bien el número de cepas analizadas es ciertamente limitado, este hallazgo resulta muy novedoso. Con respecto a las cepas G6(III)P[11] de tambo, el análisis filogenético de VP7 y VP8* no mostró ningún agrupamiento según la ubicación geográfica de los tambos. Aunque las cepas analizadas fueron pocas, este hallazgo sería esperable ya que las cepas de tambo presentan una gran diversidad genética.

Al comparar las regiones antigénicas de VP7 se observaron diferencias entre las cepas G6(III) y G6(IV). Las cepas G6(III) presentaron 7 u 8 sustituciones aminoacídicas en la regiones antigénicas y se observaron 2 sitios potenciales de glicosilación. En cambio, las cepas G6(IV) de campo y vacunales (UK, IND y NCDV) presentaron 3 sitios potenciales de glicosilación. Estos hallazgos también se observaron en un estudio previo (Badaracco *et al.*, 2013b), indicando que estas variaciones se mantienen a lo largo del tiempo. Las diferencias observadas a nivel de las regiones antigénicas de VP7 en las cepas G6(III) podrían sugerir una menor actividad neutralizante de los Ac desarrollados frente a la cepas vacunales G6(IV) (UK, IND). Sin embargo, un estudio demostró que existe neutralización cruzada entre las cepas NCDV (G6(IV)P[1]) y KN-4 (G6(V)P[11]) (Matsuda *et al.*, 1993). En función de nuestros resultados *in silico* y de la existencia de un sólo reporte de neutralización cruzada entre cepas G6 de distintos linajes, a futuro se necesitan realizar estudios *in vitro* de neutralización cruzada con cepas de campo para confirmar esta hipótesis. Para ello resulta imprescindible la adaptación de cepas de campo a cultivo celular. En el presente estudio se logró mantener una cepa G6(III)P[11]

autóctona de tambo hasta un cuarto pasaje. Sin embargo, lamentablemente, no se pudo ampliar en los pasajes sucesivos.

Con respecto a las cepas G10P[11], el número analizado fue limitado ya que ocurrieron muy pocas infecciones simples por este genotipo. Por lo tanto, es difícil establecer algún tipo de relación filogenética entre las cepas y la ubicación de los establecimientos. Desde el punto de vista filogenético, la mayoría de las cepas G10 bovinas de Argentina pertenecen al linaje VI y la cepa vacunal B223 corresponde al linaje V. Sin embargo, al comparar las secuencias deducidas de aa sólo se observaron 4 sustituciones en 2 regiones antigénicas con respecto a la cepa B223. Por lo tanto, si bien a nivel nucleotídico existen diferencias en el agrupamiento de las cepas dentro de los linajes, a nivel aminoacídico parecen ser bastante similares en las regiones antigénicas. No obstante, se necesitan realizar estudios *in vitro* de neutralización cruzada entre las cepas G10 de campo y la vacunal (B223) para comprender las implicancias de las observaciones *in silico*.

La transmisión de RVA entre especies está demostrada (Palombo *et al.*, 2002) y puede ocurrir tanto en forma natural como experimental (Cook *et al.*, 2004; Martella *et al.*, 2010). Este evento representa un mecanismo muy importante para la diversidad genética del virus (Palombo *et al.*, 2002). Actualmente, RVA ha cobrado mayor importancia como zoonosis por varias razones. Entre ellas se destacan la distribución ubicua del virus, el incremento de genotipos (G y P) inusuales en las cepas humanas, el amplio rango de especies hospedadoras (Cook *et al.*, 2004; Esona *et al.*, 2010) y la compleja cadena epidemiológica que involucra animales, humanos y ambiente (Esona *et al.*, 2010). Los genotipos inusuales para las cepas humanas suelen coincidir con aquellos presentes en las cepas de origen animal (Cook *et al.*, 2004). En los últimos años, el genotipado y los análisis filogenéticos han permitido demostrar que existe una relación genética muy próxima entre aquellas cepas humanas poco frecuentes y las cepas de origen animal (Matthijnssens *et al.*, 2009).

Los genotipos inusuales o emergentes pueden surgir como consecuencia de la transmisión directa del virus (Cook *et al.*, 2004) o por reasociación genética (simple o múltiple), la cual ocurre cuando hay transmisión seguida de co-infección entre cepas de diferentes especies (humano y animales) (Cook *et al.*, 2004; Medici *et al.*, 2008; El Sherif *et al.*, 2011). La naturaleza segmentada del genoma de RVA es una característica que facilita los eventos de reasociación (Cook *et al.*, 2004). Si las cepas de RVA de origen animal adquieren segmentos génicos originados a partir de cepas humanas, estos virus quiméricos tienen más posibilidades de diseminarse en la población (Cook *et al.*, 2004; Martella *et al.*, 2010).

El genotipo G8 está muy difundido entre las diferentes especies de animales del orden *Artiodactyla* (de pezuña hendida), ya que se lo ha podido aislar o identificar en bovinos (Sato *et al.*, 1997; Fukai *et al.*, 2004), caprinos (Louge Uriarte *et al.*, 2014), cerdos (Gouvea *et al.*, 1994b), camélidos sudamericanos (Parreño *et al.*, 2001; Matthijnsens *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2013a) y ovinos (Ciarlet *et al.*, 2008; Galindo-Cardiel *et al.*, 2011). Por otra parte, en humanos también se han encontrado cepas G8 asociadas a casos de gastroenteritis y diarrea. En Malawi, África, existe una alta prevalencia (51% de las muestras positivas) de cepas cuyos genotipos corresponden a G8P[4] y G8P[6] (Cunliffe *et al.*, 1999). Además, más recientemente, se caracterizaron molecularmente dos cepas G8 inusuales en Kenia (B12, G8P[1]) y Nicaragua (NIC522, G8P[1]). Sus constelaciones genómicas completas y los análisis filogenéticos de los 11 segmentos génicos indican su estrecha relación con cepas obtenidas de animales del orden *Artiodactyla* (bovinos entre otros) y con cepas humanas derivadas de animales. Los autores sugieren que las cepas B12 y NIC522 se transmitieron en forma directa desde animales (Bányai *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2011). En Australia, también se han identificado cepas humanas G8P[14] cuyos genes (VP7 y VP4) mostraron una estrecha relación filogenética y una elevada similitud con los respectivos genes de una cepa bovina de Japón (Tokushima 9503, G8P[11]) y otra cepa humana de Australia (MG6, G6P[14]) (Swiatek *et al.*, 2010b).

Nuestro análisis filogenético del genotipo G8 incluyó cepas humanas por dos razones, una de ellas es su presencia esporádica en las poblaciones y la otra es la existencia de cepas argentinas G8P[1] y G8P[14] que tendrían un potencial zoonótico (Matthijnsens *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2013a; Louge Uriarte *et al.*, 2014). El análisis demostró que la cepa bovina 4385VT_D_BA (G8P[11]) y otras cepas G8 argentinas (75/2010, G8P[14]; Chubut/1999/G8 P[14]; Rio_Negro/1998/G8P[1]) tuvieron sólo una moderada relación genética con las cepas humanas G8P[1] (B12) y G8P[14] (WAG8.3, NTG8, 06H9151, 1H64158, ADR019-1 y PR-1300). Sin embargo, las comparaciones de las secuencias de nt y aa de VP7 indican una elevada similitud entre la cepa 4385VT_D_BA y las diferentes cepas G8P[14] humanas de Australia (WAG8.3 y NTG8) (Swiatek *et al.*, 2010b), Italia (PR-1300) (Medici *et al.*, 2008) y Dinamarca (06H9151) (Midgley *et al.*, 2012b). Algunos autores sugieren que las cepas G8P[14] pueden originarse por múltiples eventos de transmisión y reasociación entre cepas humanas y animales, así como también entre cepas de diferentes especies de animales (Medici *et al.*, 2008). Por lo enunciado anteriormente, las cepas G8 de animales que fueron identificadas en Argentina, incluida la cepa bovina, tendrían el potencial de producir reasociaciones genéticas con cepas humanas en caso de existir contacto entre las especies hospedadoras.

El estudio filogenético de VP7 para el genotipo G6 indica que todas las cepas bovinas del linaje III forman un grupo monofilético, el cual también incluye 2 cepas G6P[9] (Hun3 y Hun4) obtenidas a partir de humanos en Hungría (Bányai *et al.*, 2003). Sin embargo, estas últimas sólo muestran una íntima relación filogenética con cepas bovinas de Eslovenia (Steyer *et al.*, 2013) y Hungría. En cuanto a las cepas bovinas de Argentina clasificadas como G6 linaje IV, ninguna de ellas mostró una relación filogenética con la cepa Ro8059 (G6P[1]). Esta última se reportó en Israel y fue aislada de un niño con diarrea que en los días previos había estado en contacto con bovinos. Su constelación genómica completa y el análisis filogenético indicaron que los 11 segmentos génicos eran de origen bovino. Este hallazgo representó una transmisión directa, sin reasociación genética, de una cepa de RVA desde un bovino hacia un niño (Doan *et al.*, 2013).

Las cepas G10 tienen un alto potencial para infectar humanos (Iturriza Gómara *et al.*, 2004) y animales, entre los cuales se incluyen búfalos (Manuja *et al.*, 2008), equinos (Gulati *et al.*, 2007) y porcinos (Pongsuwanna *et al.*, 1996). El análisis filogenético de VP7 indicó que la cepa 3DR_D_BA (G10P[11]) tiene una estrecha relación con la cepa humana R329 (G10P[9]). Este hallazgo también coincide con lo observado en un estudio filogenético previo de cepas bovinas G10P[11] de Argentina (Badaracco *et al.*, 2013b). La cepa R329 (G10P[9]) se obtuvo de un niño con diarrea que fue hospitalizado en Río de Janeiro, Brasil (Voltao *et al.*, 2006). Además, otro estudio realizado en Río de Janeiro y Niterói (Brasil) determinó que el 16% de las muestras positivas a RVA pertenecían al genotipo G10 (Santos *et al.*, 1998). Por lo tanto, las cepas G10 bovinas de nuestro país tendrían, al menos, la capacidad de producir reasociaciones genéticas con cepas de RVA humanas. Esto se sustenta aún más al observar las secuencias deducidas de aa de VP7. Las cepas bovinas G10 de Argentina y las cepas humanas R329 (G10P[9]), WDP280 (G10P[1]) y SA175 (G10P[14]) presentan numerosas mutaciones en común cuando se comparan con la cepa bovina de referencia B223. En India, las cepas G10P[11] (Iturriza Gómara *et al.*, 2004; Ramani *et al.*, 2009) y G10P[4] (Mukherjee *et al.*, 2012) han causado gastroenteritis severa en niños (Iturriza Gómara *et al.*, 2004; Ramani *et al.*, 2009) y representaron más del 80% de las muestras positivas a RV (Mukherjee *et al.*, 2012). Asimismo, las cepas G10P[11] se han asociado a infecciones asintomáticas y se identificaron en el 34% de las muestras positivas (Aijaz *et al.*, 1996). Además, una cepa G10P[11] (N155) demostró ser una reasortante de origen humano-bovino. Se cree que este tipo de cepas fueron introducidas por los bovinos y, luego de la reasociación genética con cepas de RV humano, lograron establecerse en la población de niños (Ramani *et al.*, 2009). Este contexto epidemiológico no parece extraño

para un país como India, ya que hay una alta prevalencia de cepas G10P[11] en bovinos (55,6-85,2% de las muestras positivas) (Gulati *et al.*, 1999; Varshney *et al.*, 2002) y en las ciudades existe un íntimo contacto entre personas y animales (bovinos, búfalos y ovinos) (Mukherjee *et al.*, 2012).

En Argentina se han genotipificado muestras positivas a RV que fueron obtenidas de niños procedentes de las principales ciudades del país (1996-1998) (Bok *et al.*, 2001) o de la zona sur del conurbano bonaerense (1999-2003) (Castello *et al.*, 2006). El genotipo G1P[8] fue el más frecuente, seguido por G4P[8], G2P[4] y G9P[8] (Bok *et al.*, 2001). En el segundo estudio, la mayoría ($\approx 80\%$) de las cepas fueron clasificadas como G1P[8] y G4P[8]. Más recientemente, una investigación demostró un incremento en la frecuencia de cepas G3P[8], las cuales representaron el 54% de las muestras evaluadas para el año 2009 (Stupka *et al.*, 2012). La situación epidemiológica presentada indica que la mayoría de los genotipos G y P que circulan en niños de Argentina son aquellos típicos de las cepas humanas. Aunque el genotipo G3 se ha identificado en cepas bovinas de otras partes del mundo (El-Attar *et al.*, 2002), se considera que tiene poca relevancia epidemiológica en esta última especie (Martellla *et al.*, 2010). Un hallazgo interesante en nuestro país fue la presencia de una cepa bovina cuya especificidad de VP7 correspondió al genotipo/serotipo G1, el cual es típico de las cepas humanas. La secuencia deducida de aa para esta proteína mostró un 90% de similitud con la cepa humana de referencia Wa (Blackhall *et al.*, 1992).

Los niños y adultos de las zonas rurales suelen estar en contacto con animales de producción. Por lo tanto, en esta población podrían ingresar cepas o genes de RV de origen animal (Cook *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos durante nuestra investigación y en otra previa (Badaracco *et al.*, 2013b) indican que las cepas bovinas G6(III), G8 y G10 presentan genes codificantes para VP7 con moderada o estrecha relación con aquellos presentes en cepas humanas del resto del mundo. Además, las cepas G8 de cabra (Louge Uriarte *et al.*, 2014) y camélidos sudamericanos (Parreño *et al.*, 2001; Matthijssens *et al.*, 2006; Badaracco *et al.*, 2013b) de Argentina tienen esta misma característica. Por lo tanto, a futuro será necesario evaluar muestras de niños procedentes de zonas rurales o de pequeños poblados para poder descubrir aquellas cepas inusuales.

CAPÍTULO 3

“Caracterización molecular de E. coli asociada a diarrea y septicemia en terneros de establecimientos de la provincia de Buenos Aires”



Vet. Enrique L. Louge Uriarte

1. Objetivos e hipótesis

1.1 Objetivo general

- Caracterizar los genes de virulencia de *Escherichia coli* asociada a diarrea y septicemia en terneros procedentes de establecimientos de la provincia de Buenos Aires.

1.2 Objetivos específicos

- Genotipificar los aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de muestras de materia fecal de terneros de tambo y cría para carne de establecimientos ubicados en la provincia de Buenos Aires.
- Determinar el perfil de genes de virulencia en aislamientos de *E. coli* obtenidos de terneros de tambo con septicemia y describir la patología asociada a esta bacteria.

1.3 Hipótesis de trabajo

- El patotipo ETEC no es el más frecuente en terneros de tambo y cría para carne con diarrea neonatal.
- La frecuencia en la detección de genes de virulencia correspondientes a diferentes patotipos de *E. coli* es mayor en terneros con diarrea que en terneros sin signos diarreicos.
- Los perfiles de genes de virulencia de *E. coli* en aislamientos de materia fecal se corresponden a los hallados en aislamientos de órganos y fluidos corporales de terneros con septicemia.

2. Materiales y métodos

2.1 Establecimientos

Durante el estudio (2007-2013) se seleccionaron 16 establecimientos (tambos, $n = 10$; campos de cría, $n = 6$) para recolectar muestras de MF en terneros diarreicos y sin diarrea. Por otra parte, se escogieron 3 tambos en donde se obtuvieron muestras de órganos o fluidos corporales de terneros con cuadro clínico de septicemia y meningitis. El tipo de muestreo fue no-probabilístico (Thrusfield, 2005), basado en la demanda o colaboración por parte de los veterinarios. La mayoría de los establecimientos ($n = 15$) presentaron casos de DNT al momento de la visita y cada muestreo incluyó al menos un 20% de terneros con diarrea. La única excepción a esta premisa fue el muestreo realizado en un tambo del partido de Gral. Pueyrredón, el cual incluyó un 7% de terneros diarreicos. De acuerdo a la información obtenida, el 46% de los tambos y el 100% de los campos de cría aplicaban vacunas a las hembras gestantes para prevenir la DNT de los terneros.

Los tambos seleccionados se encontraban ubicados en las cuencas lecheras Mar y Sierras (9 tambos), Oeste (1) y Abasto Norte (1). La distribución de los mismos abarcó 6 partidos de la provincia de Buenos Aires, entre los cuales se incluyeron Balcarce (2), Carmen de Areco (1), Gral. Pueyrredón (2), Lobería (1), Mar Chiquita (2), Olavarría (2) y Trenque Lauquen (1). Los campos de cría para carne estaban situados en la Cuenca del Salado (5 campos) y en la Depresión de Laprida (1), dos de las principales zonas de cría de la provincia de Buenos Aires (Carrillo, 2001). La distribución de los campos abarcó a 5 partidos de la provincia, los cuales incluyeron Gral. Pueyrredón (1), Mar Chiquita (2), Olavarría (1), Pila (1) y Rauch (1).

2.2 Terneros y muestras de materia fecal

En los establecimientos lecheros se recolectaron 121 muestras de MF a partir de terneros diarreicos ($n = 60$) y sin diarrea ($n = 61$), representando el 49,6% y 50,4% de las muestras, respectivamente. En los días previos al muestreo, 8 terneros recibieron antibióticos para el tratamiento de la diarrea; estos animales se clasificaron como diarreicos, independientemente de las características de la MF al momento del muestro. El tamaño de muestra promedio fue de 11 terneros (rango de 5-16). La raza de la mayoría de los animales muestreados fue Holando Argentino, aunque en dos tambos se criaban terneros de la raza Jersey o cruce de Jersey x Holando Argentino. A partir de la información disponible, se determinó que la edad promedio de los terneros evaluados fue de 17,6 días (rango 2-69). Todos los tambos utilizaban el sistema de

crianza individual en estaca o casilla y la alimentación incluyó leche (50%), sustituto lácteo (30%) o ambos (20%).

En los campos de cría se recolectaron 91 muestras de MF de terneros diarreicos ($n = 66$) y sin diarrea ($n = 25$), constituyendo el 72% y 28% de las muestras, respectivamente. En los días previos al muestreo, un total de 11 terneros habían sido tratados con antibióticos para la diarrea; estos animales se clasificaron como diarreicos, independientemente de la consistencia de la MF al momento de recolectar las muestras. La raza principal de los terneros fue Aberdeen Angus, aunque también se incluyeron animales de la cruce Aberdeen Angus x Hereford. Todos los terneros tenían menos de 60 días de vida al momento del muestro. Con respecto al manejo, los animales se mantuvieron junto a sus madres en pasturas y pastizales naturales hasta el destete.

Las muestras de MF se recolectaron desde el recto y se colocaron en recipientes plásticos, estériles y con cierre hermético, manteniéndose refrigeradas hasta su llegada al laboratorio (dentro de las 48 h).

2.3 Terneros de tambo y muestras de órganos y fluidos corporales

El estudio de terneros ($n = 9$) con cuadro clínico de septicemia (decaimiento, decúbito y reflejo de succión débil) y meningitis (ver signos a continuación) se realizó en 3 tambos ubicados en las cuencas lecheras Oeste (A) y Mar y Sierras (B y C). En el tambo A sólo se obtuvieron especímenes de órganos y fluidos corporales, mientras que en los tambos B y C también se recolectaron muestras de MF. El tambo A presentó elevados índices de mortalidad mensual (2-22%) en los terneros menores a 60 días de vida. El sistema de crianza era colectivo (corrales de 20 terneros) y la alimentación consistía de leche (80%), calostro y leche de vacas con mastitis y tratadas con antibióticos; además se les suministraba un balanceado iniciador. El manejo del calostrado consistía en dejar a los terneros junto a sus madres durante medio día y aquellos terneros más débiles recibían en forma manual un pool de calostro de calidad desconocida.

Los terneros con cuadro clínico de septicemia y meningitis se identificaron como: T1 (17 días de vida), T2 (15 días), T3 (21 días), T4 (12 días), T5 (15-20 días) y T6 (35 días) (tambo A); T7 (4 días) y T8 (13 días) (tambo B); T9 (30 días) (tambo C). Los animales se presentaron en decúbito y manifestaron decaimiento (T4, T7, T8 y T9), diarrea (T4, T5, T7 y T8) y deshidratación (T7 y T8). Además, la mayoría de los terneros del tambo A (T1, T2, T3, T5 y T6) mostraron signología nerviosa (temblores, ataxia, opistótono, convulsiones, bruxismo y nistagmo) seguida de muerte. Previo a la obtención de las muestras, al menos 3 terneros (T1, T2 y T4) habían recibido tratamiento con antibióticos.

A partir de los 9 terneros se recolectaron 35 muestras de órganos ($n = 29$) y fluidos corporales ($n = 6$) para cultivo bacteriológico (CB) ($n = 26$) e histopatología (HP) ($n = 22$). Las muestras analizadas fueron las siguientes: bazo (CB, $n = 4$; HP, $n = 2$), cerebro (CB, $n = 6$; HP, $n = 4$), hígado (CB, $n = 2$; HP $n = 5$), intestino (CB, $n = 2$), linfonódulo mesentérico (CB, $n = 1$), pulmón, (CB, $n = 4$; HP, $n = 6$), riñón (CB, $n = 1$; HP, $n = 5$), bilis (CB, $n = 3$), hisopado nasal (CB, $n = 1$), líquido sinovial (CB, $n = 1$) y líquido cefalorraquídeo (CB, $n = 1$). Las muestras para cultivo bacteriológico se colocaron en recipientes plásticos, estériles y con cierre hermético, manteniéndose refrigeradas hasta su llegada al laboratorio (dentro de las 48 h). Los especímenes para histopatología se fijaron en formol al 10% (Apéndice 2).

2.4 Bacteriología

2.4.1 Cultivo y aislamiento de *E. coli* a partir de muestras de MF

Las muestras de MF se sembraron en placas de agar MacConkey (AMC) (Difco, MD, USA) (Apéndice 2) y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h en condiciones aerobias. Posteriormente, el crecimiento confluyente de cada placa (primera estría) se sembró por puntura en un tubo con agar y caldo nutritivo (0,75% de agar, p/v) (BD, Sparks, USA) (Apéndice 2), el cual se conservó a temperatura ambiente (Blanco *et al.*, 2003; Lazo Pérez *et al.*, 2009). Estas condiciones mantienen la viabilidad de *E. coli* por al menos 5 años, sin necesidad de resiembra (Blanco y Blanco, 1993).

Para obtener colonias individuales, se tomó el crecimiento confluyente desde el agar nutritivo y se sembró en una placa de AMC, la cual se incubó en las condiciones mencionadas. Posteriormente, se seleccionaron 10 colonias fermentadoras de la lactosa (L+) y cuyas características morfológicas fueron compatibles con *E. coli*. Estas colonias se sembraron en una placa con agar triptona de soya (TSA) (Difco, MD, USA) (Apéndice 2) dividida en 10 cuadrantes. La incubación se hizo a 37 °C durante 18-24 h en condiciones aerobias.

2.4.2 Cultivo y aislamiento bacteriológico a partir de órganos y fluidos corporales

Las muestras de órganos y fluidos corporales se sembraron en placas con AMC (Difco, MD, USA) y agar base Columbia (Oxoid, Hampshire, ENG), al cual se le agregó sangre bovina defibrinada (v/v, 7%) (Apéndice 2). Las mismas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h en condiciones aerobias. El crecimiento L+ de cada placa de AMC se conservó en agar y caldo nutritivo (0,75% de agar, p/v) (BD, Sparks, USA). La obtención de colonias individuales L+ y su posterior siembra en TSA se realizaron siguiendo los procedimientos descritos (apartado 2.3.1).

Las muestras para cultivo de *Salmonella* spp. se sembraron en caldo tetrionato (TT) (20 ml) (Oxoid, Basingstoke, UK), al cual se le adicionaron las soluciones de iodo-ioduro (0,2 ml/10 ml de caldo), verde brillante al 0,1% (0,1 ml/10 ml de caldo) y novobiocina (0,1 ml/10 ml de caldo). Posteriormente, se realizaron subcultivos en agar XLD (Oxoid, Basingstoke, UK) tomando alícuotas del caldo TT a las 24, 72 y 120 h de incubación. Los subcultivos en agar XLD se mantuvieron a 37 °C en condiciones aerobias. La identificación de los aislamientos bacterianos a nivel de género se hizo por pruebas bioquímicas de rutina para enterobacterias (Barrow y Feltham, 1993; Quinn *et al.*, 1994).

2.4.3 Identificación de *E. coli*

Los aislamientos de *E. coli* se identificaron mediante pruebas bioquímicas de rutina para enterobacterias, entre las cuales se incluyeron oxidasa, movilidad, oxidación-fermentación (Hugh-Leifson), indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, ureasa, utilización del citrato y producción de ácido sulfhídrico (agar hierro de Kligler) (Barrow y Feltham, 1993; Quinn *et al.*, 1994). Adicionalmente, los aislamientos de *E. coli* se identificaron por PCR (apartado 2.5.1) utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 2.3) que permiten amplificar un fragmento (340 pb) del gen codificante para el ARNr 16S (Malinen *et al.*, 2003; Bicalho *et al.*, 2010).

2.5 Extracción y conservación del ADN

La extracción de ADN se realizó por el método de ebullición. Para ello se tomó una ansada del crecimiento confluyente (desde la placa de AMC) y se resuspendió en 300 µl de agua ultrapura estéril (tubo de 1,5 ml). Posteriormente, la suspensión bacteriana se homogeneizó y se incubó en un baño con agua (100 °C x 5 min). Una vez finalizada la lisis bacteriana, el tubo se centrifugó (11000 rpm x 2 min.) para separar el sobrenadante (ADN bacteriano) de los restos de pared celular. Luego, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se almacenó a -20 °C hasta ser utilizado en las amplificaciones. Las extracciones de ADN a partir de los pooles de 5 colonias y de cada colonia individual se realizaron siguiendo el mismo procedimiento. No obstante, para resuspender las colonias individuales y extraer su ADN se utilizaron 150 µl de agua ultrapura estéril (tubo de 0,5 ml) (Blanco *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2006).

2.6 Detección de genes de virulencia de *E. coli*

Los sobrenadantes con ADN se analizaron por PCR para detectar los diferentes genes de virulencia (GV) (Tabla 4.3) que caracterizan a los patotipos de *E. coli*. A continuación se presenta un diagrama de flujo (Fig. 1.3) en el cual se describen los pasos a seguir hasta obtener resultados de las colonias individuales

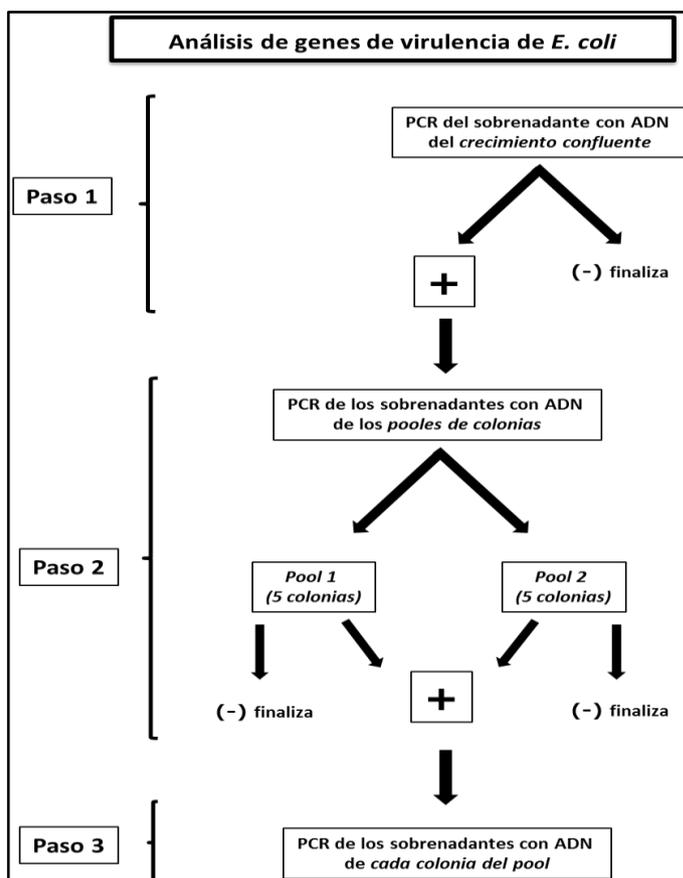


Fig. 1.3. Representación esquemática de los pasos a seguir para caracterizar los GV en aislamientos de *E. coli*.

2.6.1 Amplificación de genes de virulencia por PCR

La detección de GV se realizó mediante la amplificación por PCR simple de fragmentos intragénicos. Para ello se utilizó un protocolo estándar de PCR que fue desarrollado previamente (Blanco *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2004). Primero, se preparó la mezcla de PCR (Tabla 1.3) en función del número total de reacciones. Luego, para cada reacción se tomaron 23 μ l de la mezcla de PCR y se colocaron en tubos de 0,2 ml libres de nucleasas (Axygen Inc., CA, USA). A continuación, se agregaron 7 μ l de sobrenadante (con ADN bacteriano) y la mezcla se homogeneizó con pipeteo suave. Las cantidades de cada reactivo en la mezcla de PCR (30 μ l) fueron las siguientes: 150 ng de cada oligonucleótido, 200 μ M de cada desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Promega, Madison, USA), 1X de *buffer* de reacción (1,5 mM MgCl₂, pH 8,5) y 1 U de *Taq* polimerasa de ADN (Promega, Madison, USA).

Tabla 1.3. Mezcla de PCR para el protocolo estándar

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O	15,2
<i>Buffer 5X</i> ^a (7,5 mM Cl ₂ Mg, pH 8,5)	6
dNTPs (10mM) ^b	0,6
Oligonucleótido-F (300 ng/ μl)	0,5
Oligonucleótido-R (300 ng/ μl)	0,5
Taq polimerasa (5U/μl) ^a	0,2
Subtotal	23
ADN bacteriano	7
Total	30

^aPromega, Madison, WI, USA. ^bDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

El análisis de ciertos GV (*afa-8*, *cnf*, *cnf1*, *cnf2*, *EHEChlyA*, *vtx1* y *vtx2*) y la detección del gen *16S rRNA*, específico de *E. coli*, se realizaron bajo condiciones diferentes a las especificadas en el protocolo estándar. Primero, las cantidades de cada par de oligonucleótidos se ajustaron según lo indicado en las publicaciones de referencia: AFAE8-F/AFAE8-R (27μM, c/u) (Lalioui *et al.*, 1999), CNF-F/CNF-R (54 ng, c/u), CNF1-F/CNF1R (450 ng, c/u), CNF2F/CNF2R (450 ng, c/u) (Blanco *et al.*, 1996) y HLY1/HLY2 (60 ng, c/u) (Yamamoto *et al.*, 1995) (Tabla 4.3). Segundo, las concentraciones de MgCl₂ se optimizaron para aumentar la eficiencia de amplificación de algunos genes: *EHEChlyA* (3 mM), *vtx1* (4,5 mM), *vtx2* (4,5 mM), *16S rRNA* (6 mM) (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Mezcla de PCR para detección de *vtx1*

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O	11,6
<i>Buffer 5X</i> ^a (7,5 mM Cl ₂ Mg, pH 8,5)	6
dNTPs (10mM) ^b	0,6
MgCl ₂ (25 mM) ^c	3,6
VT1-F (300 ng/ μl)	0,5
VT1-R (300 ng/ μl)	0,5
Taq polimerasa (5U/μl) ^a	0,2
Subtotal	23
ADN bacteriano	7
Total	30

^aPromega, Madison, WI, USA. ^bDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

Por otra parte, la detección del gen conservado *cdtB* se realizó mediante un protocolo de PCR múltiple (Tabla 3.3) con 4 oligonucleótidos universales (Tabla 4.3). Dicho protocolo permite identificar la presencia de *cdtB*, independientemente del tipo de toxina (CDT-I, CDT-II, CDT-III y CDT-IV) que sea capaz de producir la cepa de *E. coli* (Tóth *et al.*, 2003). Además, se utilizó un protocolo de PCR múltiple basado en 3 oligonucleótidos específicos (Tabla 4.3), el cual permite demostrar la presencia de *vtx2* (Azucena Mora *et al.*, 2011).

Tabla 3.3. Mezcla de PCR para detección de *cdtB*

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O	14,2
<i>Buffer</i> 5X ^a (7,5 mM Cl ₂ Mg, pH 8,5)	6
dNTPs (10mM) ^b	0,6
CDT-s1 (300 ng/ μl)	0,5
CDT-s2 (300 ng/ μl)	0,5
CDT-as1 (300 ng/ μl)	0,5
CDT-as2 (300 ng/ μl)	0,5
Taq polimerasa (5U/μl) ^a	0,2
Subtotal	23
ADN bacteriano	7
Total	30

^aPromega, Madison, WI, USA. ^bDesoxinucleótidos trifosfato; Promega, Madison, WI, USA.

Las secuencias de los oligonucleótidos, sus condiciones de *annealing* (tiempo y temperatura) y el tamaño esperado para los productos de amplificación se detallan en la Tabla 4.3. En cada ensayo de PCR se incluyeron controles positivos (ADN cepas de referencia, apartado 3.5.3) y negativos (H₂O ultrapura estéril y ADN de la cepa *E. coli* DH5α). Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 94 °C x 3 min. (desnaturalización), 35 ciclos de 94 °C x 1 min. (desnaturalización), 48-65 °C x 40-90 seg. (*annealing*, Tabla 4.3), 72 °C x 2 min. (síntesis de ADN) y finalmente 72 °C x 3 min. (elongación). Las reacciones se realizaron en un termociclador *Px2* (Thermo Scientific).

2.6.2 Electroforesis y revelado de los productos de PCR

Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (BrEt) o con colorante SYBR *Safe* (Life Technologies Corporation, USA). Para ello se preparó una solución de agarosa al 1,8 % (p/v) (Biodynamics SRL, Argentina) en *buffer* TAE 1X (ver *Apéndice 2*). Esta solución se calentó hasta lograr una disolución completa y posteriormente se le agregó BrEt (10 mg/ml) a una concentración final de 0,5 µg/ml o colorante SYBR *Safe* según las recomendaciones de uso (1µl colorante/10 mL de *buffer* TAE1X con agarosa al 1,8%). Los geles se corrieron a 90 V durante 1 h y 15 min en cubas electroforéticas (Labnet Inc, USA) conectadas a una fuente de poder (Consort EV 265, Belgium). Los geles se visualizaron con una lámpara UV.

2.6.3 Cepas de referencia de *E. coli*

En cada ensayo de PCR se incluyeron cepas de referencia como controles positivos de reacción. Las cepas utilizadas, sus factores de virulencia, las especies de origen y los investigadores que gentilmente las cedieron se detallan a continuación: FV10186 (**intimina**; porcino), FV10187 (**vtx2e**, **STa**, **STb**, **F18**; porcino), FV10188 (**LT**, **STb**, **K88**; porcino), FV10189 (**LT**, **STa**, **STb**, **F18**; porcino), FV10190 (**STa**, **P987**; porcino), FV10191 (**STa**, **K99**, **F41**; bovino), FV10192 (**F17**; ovino), FV10193 (**Pap**, **Afa**, **aerobactina**; humano), FV10194 (**Afa**, **aerobactina**; humano), FV10195 (**CNF-1**, **Pap**, **Sfa**, **Hly**, **aerobactina**; humano) y FV10196 (**CDT**, **Sfa**, **K1**, **aerobactina**; humano) (Dr. Jorge Blanco, Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Fac. de Veterinaria, Univ. de Santiago de Compostela, Lugo, España); S5 (**CNF2**, **CDT-III**, **F17**; ovino), FVL16 (**Pap**, **Sfa**; humano), J96 (**CNF-1**, **CDT-IV**; humano), 239KH89 (**CNF-1**, **Pap**, **AFA-VIII**; bovino), EDL 933 (**vtx1**, **vtx2**, **intimina**; bovino), 146N (**vtx1**, **vtx2**, **intimina**; bovino) (Dra. Elsa Mercado, Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA Castelar); B41 (**K99**, **F41**, **STa**; bovino) y 31A (**CS31A**, **F17**; bovino) (Dr. Contrepolis, Lab. de Microbiología, INRA, Centre de Recherche Clermont-Ferrand-Theix, France); 2/02 (**vtx2**, **intimina**, **Ehly**; humano) y EPEC (**BFP**, **intimina**; humano) (Dra. Marta Rivas, Servicio Fisiopatogenia, INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina).

Tabla 4.3. Oligonucleótidos y condiciones de ciclado para la detección por PCR de genes asociados a virulencia

Gen (factor) de virulencia	Primers	Secuencia (5' → 3')	Temp. (°C) y tiempo (seg.) <i>annealing</i>	Tamaño (pb)	Referencia
<i>afa-8</i> (AFA-VIII)	AFAE8-F AFAE8-R	CTAACTTGCCATGCTGTGACAGTA TTATCCCCTGCGTAGTTGTGAATC	65, 60	302	Lalioui <i>et al.</i> , 1999
<i>bfp</i> (BFP)	EP1 EP2	AATGGTGCTTGCCTTGTCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	60, 60	326	Gunzburg <i>et al.</i> , 1995
<i>cdtB</i> (CDT)	CDT-s1 CDT-s2 CDT-as1 CDT-as2	GAAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	58, 40	466	Tóth <i>et al.</i> , 2003
<i>clpG</i> (CS31A)	clpG1 clpG2	GGGCGCTCTCTCCTTCAAC CGCCCTAATTGCTGGCGAC	55, 60	402	Bertin <i>et al.</i> , 1998
<i>cnf</i> (CNF)	CNF-F CNF-R	CAATGGCAACAAAAATATCTTCT GAACGACGTTCTTCATAAGTATC	56, 40	1147	
<i>cnf1</i> (CNF1)	CNF1-F CNF1-R	GAACTTATTAAGGATAGT CATTATTTATAACGCTG	48, 40	543	Blanco <i>et al.</i> , 1996
<i>cnf2</i> (CNF2)	CNF2-F CNF2-R	AATCTAATTAAGAGAAC CATGCTTTGTATATCTA	48, 40	543	Blanco <i>et al.</i> , 1996
<i>eae</i> (intimina)	EAEV3-F EAEMB-R	CATTGATCAGGATTTTTCTGGT TCCAGAATAATATTGTTATTACG	55, 40	510	Azucena Mora <i>et al.</i> , 2011
<i>EHEChlyA</i> (EHly)	hlyA1 hlyA4	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	57, 90	1551	Schmidt <i>et al.</i> , 1995
<i>eltA</i> (LT)	LT-FN LT-B	CGTTCGGAGGTCTTATGCC CCGAATTCTGTATATATGTC	55, 40	660	Frankel <i>et al.</i> , 1989
<i>f17G</i> (F17)	F17-F F17-R	GGGCTGACAGAGGAGGTGGGGC CCC GGCGACAACCTCATCACCGG	60, 40	411	Vu-Khac <i>et al.</i> , 2006
<i>f41</i> (F41)	F41-A F41-RN	GGCTATGGAAGACTGGAGAGGG GACTGAGGTCATCCCAATTGTGG	55, 40	546	Blanco <i>et al.</i> , 2006
<i>hlyA</i> (Hly)	HLY1 HLY2	AACAAGGATAAGCACTGTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	56, 40	1177	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>iucD</i> (aerobactina)	AER1 AER2	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	60, 40	602	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>k99</i> (K99)	K99A K99B	CCAGCGCCCGGCAGTAATGACTGC CCACCATTAGACGGAGCGCGG	60, 40	278	Blanco <i>et al.</i> , 2006
<i>papC</i> (Pap)	PAP1 PAP2	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG TCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	60, 40	328	Le Bouguenec <i>et al.</i> , 2001
<i>sta</i> (STa)	STa1 STa2	ATTTTTATTTCTGTATTGTCTTT GGATTACAACACAGTTCACAGCAGT	48, 40	178	Penteado <i>et al.</i> , 2002
<i>stb</i> (STb)	STb1 STb2	ATCGCATTCTTCTTGCATC GGGCGCAAAGCATGCTCC	55, 40	172	Blanco <i>et al.</i> , 1997
<i>stx₁/vtx₁</i> (Stx1/VT1)	VT1-F VT1-R	TCGCTGAATGTCATTTCGCTCTGC TCAGCAGTCATTACATAAGAAC	50, 40	539	Azucena Mora <i>et al.</i> , 2011
<i>stx₂/vtx₂</i> (Stx2/VT2)	VT2-F1 VT2-F2 VT2-R	TTTCTTCGGTATCCTATTCCC TGTCTTCAGCATCTTATGCAG CTGCTGTCCGTTGTCATGGAA	50, 40	358	Azucena Mora <i>et al.</i> , 2011
<i>16S rRNA</i> ^(†)	16SF 16SR	GTT AAT ACC TTT GCT CATTGA ACC AGG GTA TCT AAT CCTGTT	60, 20	340	Malinen <i>et al.</i> , 2003

(†) La amplificación de un fragmento intragénico del *16S rRNA* se utilizó para identificar *E. coli*.

2.7 Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos

A partir de los terneros con septicemia y meningitis se seleccionaron cepas de *E. coli* ($n = 5$) teniendo en cuenta el ternero, los órganos de los cuales se aislaron, las lesiones histológicas y el perfil de GV. Se evaluó la sensibilidad *in vitro* de las cepas frente a diferentes antibióticos. Para ello se utilizó la prueba de difusión con discos individuales de Kirby-Bauer, siguiendo las normas establecidas por el CLSI (CLSI, 2010). Brevemente, la superficie de una placa con agar Müeller-Hinton (Oxoid, Hampshire, ENG) se sembró con un hisopo estéril embebido en una suspensión bacteriana de turbidez estandarizada (equivalente a 0,5 en la escala de McFarland) (McFarland, 1907). Posteriormente, se colocaron los discos impregnados con antibióticos a diferentes concentraciones (Oxoid, Hampshire, ENG; Britania, CABA, Argentina). Las placas se incubaron durante 18-20 h a 37 °C en condiciones aerobias y luego se midieron los halos de inhibición del crecimiento, interpretándose los resultados como sensible o resistente.

Se evaluaron un total de 16 antibióticos pertenecientes a ocho familias, entre ellas: (1) anfenicoles (florfenicol 30 µg, FFC30), (2) aminoglucósidos (estreptomicina 300 µg, S300; gentamicina 10 µg, GEN10), (3) fluoroquinolonas (enrofloxacina 5 µg, ENR5), (4) penicilinas (amoxicilina/ácido clavulánico 30 µg y 10 UI, AMC30), (5) cefalosporinas (cefalexina 30 µg, CL30; cefalotina 30 µg, CEF30; cefaclor 30 µg, CEC30; cefotaxima 30 µg, CTX30; cefquinoma 30 µg, CEQ30), (6) macrólidos (eritromicina 15 µg, ERY15; tilmicosina 15 µg, TIL15), (7) tetraciclinas (oxitetraciclina 30 µg, OT30; doxiciclina 30 µg, DO30), (8) sulfonamidas (sulfonamida 300 µg, S3 300; sulfometoxazol/trimetoprima, 25 µg TMS25). Como criterio de clasificación se consideró multirresistente a todo aislamiento de *E. coli* que presentó resistencia a cuatro o más familias de antibióticos (Bywater *et al.*, 2004; Sáenz *et al.*, 2004).

2.8 Análisis estadístico

Las proporciones de muestras positivas a los diferentes GV de *E. coli* se analizaron teniendo en cuenta la condición clínica de los terneros (diarreicos vs. sin diarrea) en cada sistema productivo. A su vez, se compararon las frecuencias de muestras positivas a GV de *E. coli* entre terneros diarreicos de tambo y terneros con diarrea de cría. Las proporciones de colonias positivas a 2 o más GV se evaluaron en función de la condición clínica (diarrea y sin diarrea) de los terneros en cada sistema productivo. Para contrastar la asociación entre variables se confeccionaron tablas de contingencia (2 X 2) y se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) con un nivel de significación (p valor) de 0,05. La prueba exacta de Fisher se utilizó para aquellas variables con observaciones esperadas menores o iguales a 5. Las pruebas estadísticas se ejecutaron con el paquete estadístico SAS 9.0.

3. Resultados

3.1 Detección genotípica de factores de virulencia de *E. coli* en materia fecal

El 90% (109/121) de las muestras de terneros de tambo presentaron un crecimiento confluyente con predominio de bacterias L+ y las mismas fueron procesadas para analizar los GV. Las muestras restantes ($n = 12$) no fueron incluidas en el estudio, ya que hubo predominio de bacterias L(-). El 74,3% (81/109) de las muestras resultaron positivas para al menos un marcador genético de virulencia y sus frecuencias relativas se detallan en la Fig. 2.3.

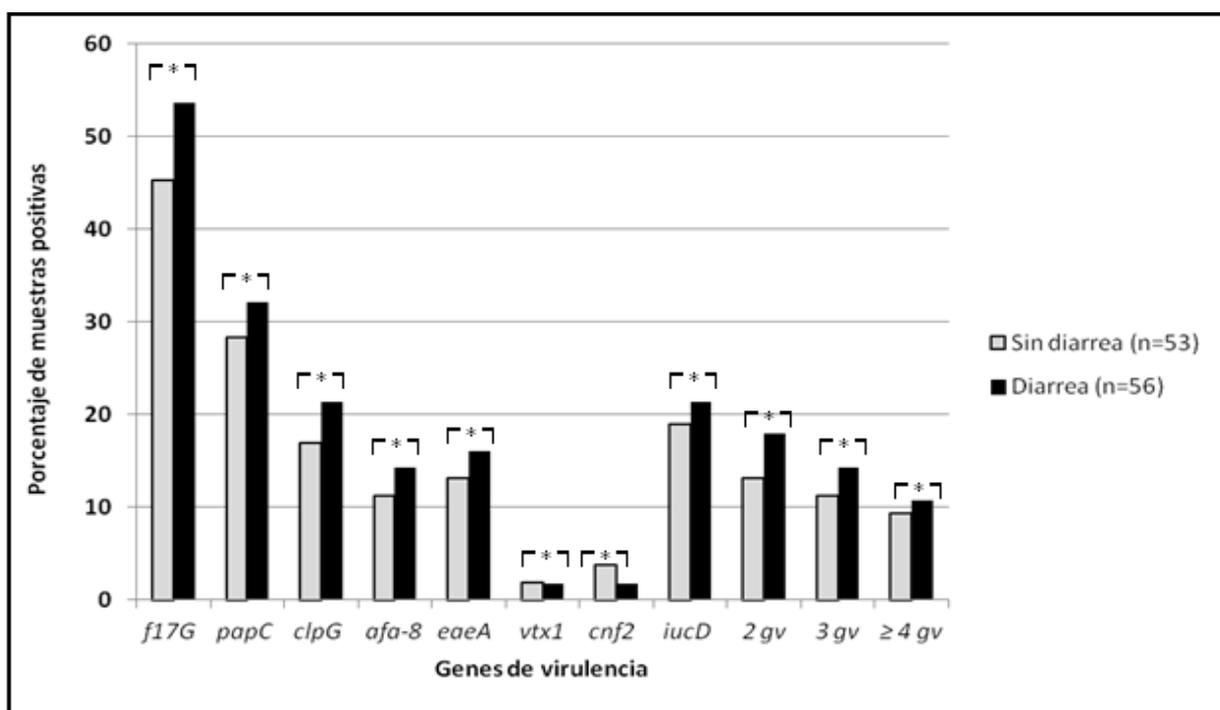


Fig. 2.3. Distribución de frecuencias relativas para los GV de *E. coli* en heces de terneros de tambo. El símbolo Γ^* indica que las diferencias entre grupos (diarrea vs. sin diarrea) no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$); gv (genes de virulencia).

En las heces de ambos grupos de terneros (diarrea, $n = 56$; sin diarrea, $n = 53$) se detectaron genes asociados a fimbrias (*f17G*, *clpG* y *papC*), adhesinas afimbriales (*afa-8* y *eae*) y al sideróforo aerobactina (*iucD*). El 50% de las muestras resultaron positivas a *f17G* (F17) (Figs. 2.3 y 3.3), mientras que en el 30,3% de las mismas se detectó *papC* (operón *pap*) (Figs. 2.3 y 6.3). Asimismo, el 20,2% de las MF fueron positivas para *iucD* (aerobactina) (Figs. 2.3 y 5.3) y el 19,3% presentó el marcador *clpG* (CS31A) (Figs. 2.3 y 6.3). Estos resultados indican un predominio de los GV que caracterizan a los patotipos SePEC (o tipo-ExPEC) (*f17G*, *clpG*, *papC*, *iucD* y *afa-8*) y EPEC/EHEC (*eae*) (Fig. 6.3). Los genes codificantes para las toxinas VT1 (*vtx1*, VTEC) (Fig. 6.3) y CNF2 (*cnf2*, NTEC2) se detectaron con baja frecuencia (1,8% y 2,8%,

respectivamente). Ninguna muestra resultó positiva a los GV típicos de ETEC (*sta*, *stb*, *eltA*, *f5* y *f41*).

Al comparar ambos grupos de terneros de tambo (diarrea y sin diarrea), los animales con diarrea mostraron una mayor frecuencia de positividad para los distintos GV. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas para ningún marcador genético ($p > 0,05$). En este mismo sentido, las frecuencias relativas de muestras positivas a 2, 3 y 4 o más GV fueron similares en los dos grupos de terneros ($p > 0,05$).

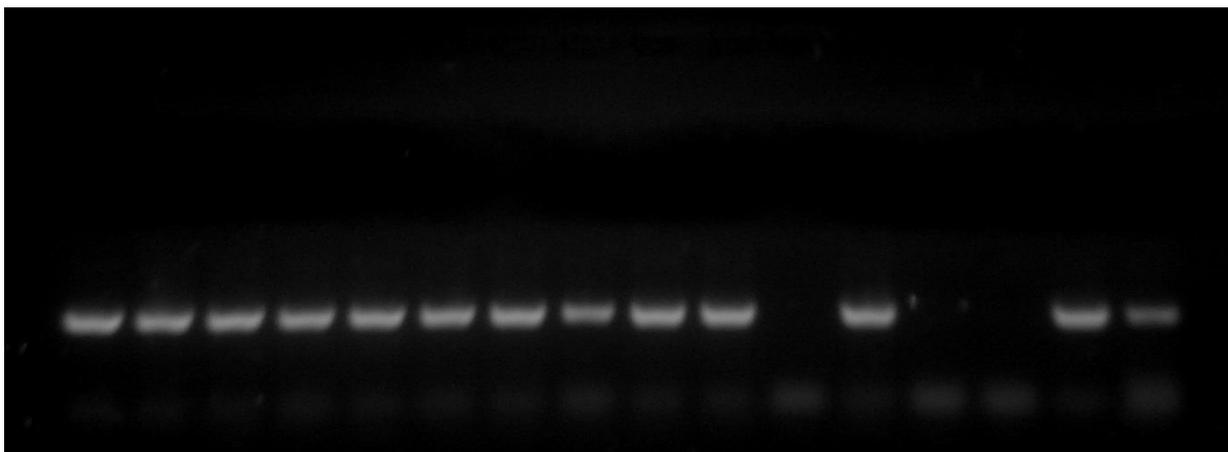


Fig. 3.3. Productos de PCR correspondientes a *f17G* (411 pb). Colonias (c) de *E. coli* aisladas a partir de MF de terneros de tambo (T). Calles: 1-10, T116 (c1 a c10). Calles 11-15, T117 (c1 a c5). Calle 16, cepa FV10192. Gel de agarosa (1,8%) teñido con SYBR Safe y fotografiado con luz UV.

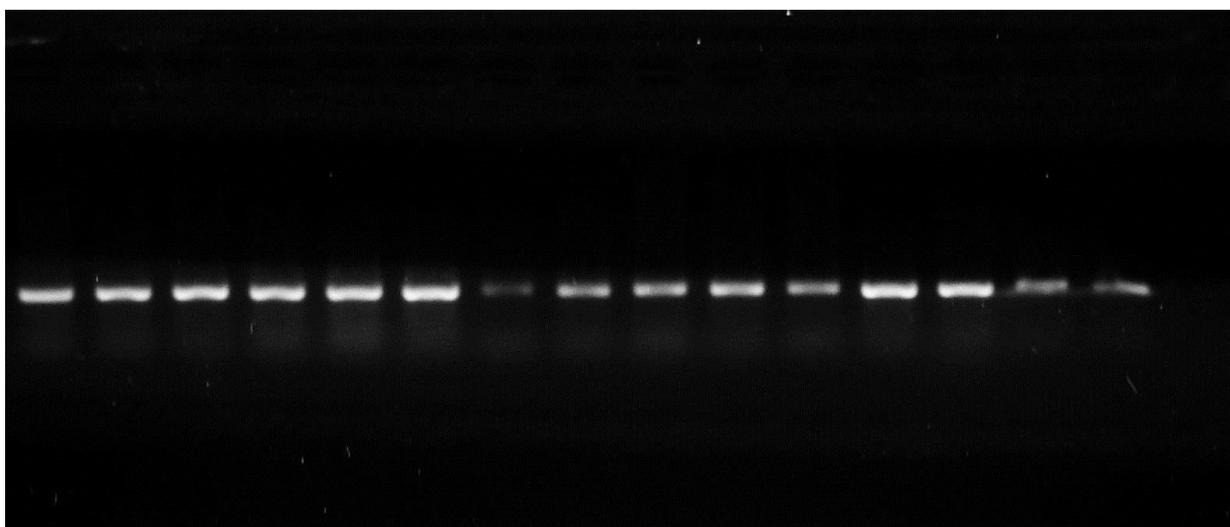


Fig. 4.3 Productos de PCR correspondientes a *papC* (602 pb). Colonias (c) de *E. coli* aisladas de MF de terneros de cría (C) y de órganos de terneros de tambo (T) con septicemia. Calles: 1-6, C3 (c1 a c6). Calle 7, C11 (c1). Calles 8-13, T1 (c1, c2 y c3; cerebro), T4 (c1, c2 y c3; bazo). Calles 14 y 15, cepas FV10195 y 239KH89. Calle 16, control negativo. Gel de agarosa (1,8%) teñido con SYBR Safe y fotografiado con luz UV.

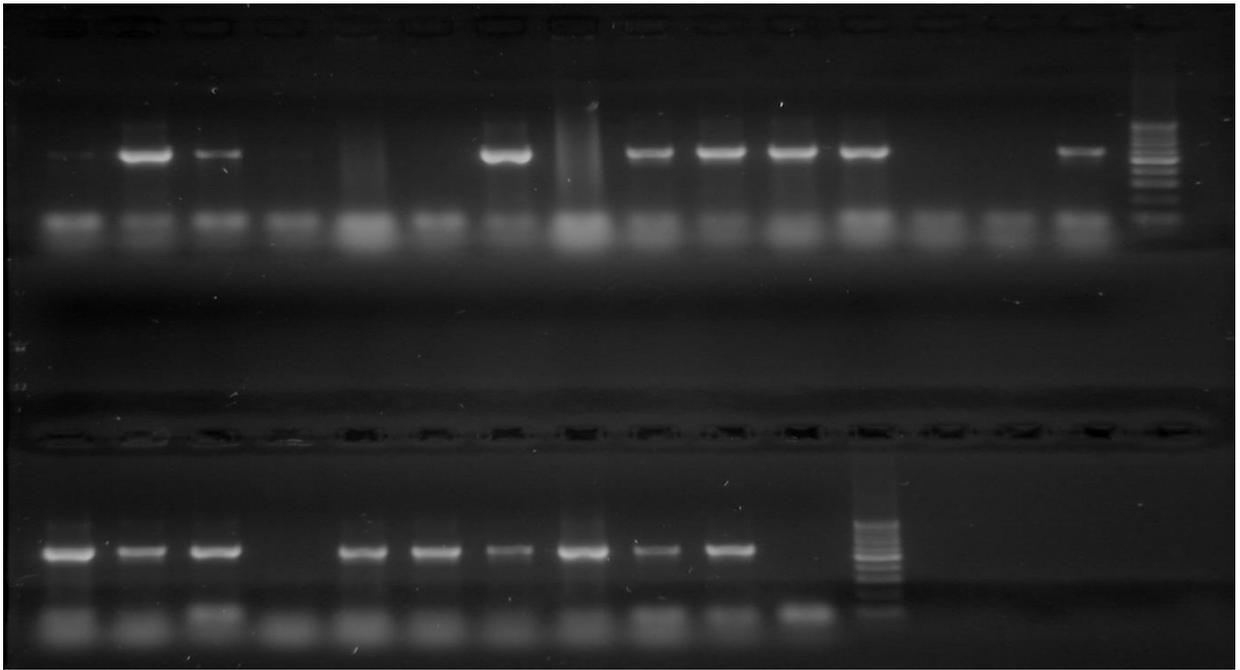


Fig. 5.3 Productos de PCR correspondientes a *iucD* (602 pb). Crecimiento confluyente con *E. coli* aisladas a partir de MF y órganos de terneros de tambo (T). Calles 1-14 (fila superior): MF de T17, T18, T19, T22, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29, T30, T31, T33. Calle 15, cepa FV10195. Calle 16, marcador de ADN (100-1000 pb). Calles 1-7 (fila inferior): T7 (pulmón, riñón y bazo), T5 (pulmón), T7 (cerebro y liquid sinovial) y T8 (bazo). Calles 8-10 (fila inferior), cepas FV10193, FV10194 y FV10195. Calle 11, control negativo. Calle 12, marcador de ADN (100-1000 pb). Gel de agarosa (1,8%) teñido con SYBR Safe y fotografiado con luz UV.

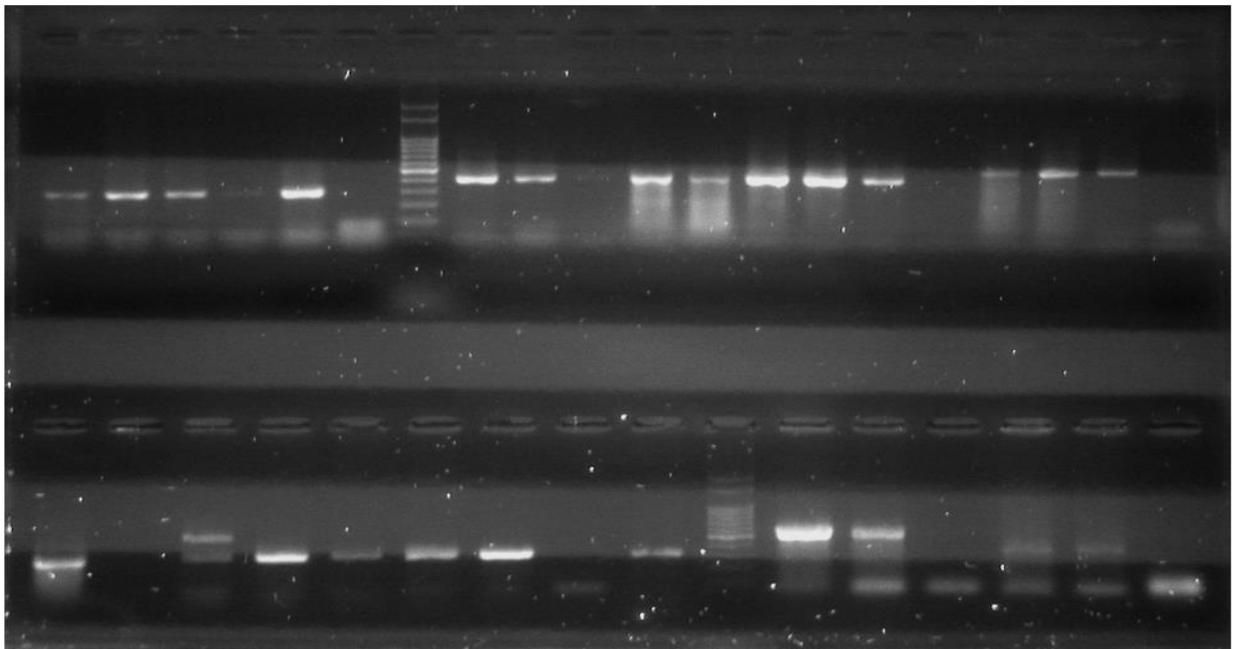


Fig. 6.3. Productos de PCR correspondientes a diferentes GV de *E. coli*. Crecimientos confluentes de *E. coli* y colonias (c) aisladas a partir de MF de terneros de tambo (T) y cría para carne (C). Calles 1-4 (fila superior): T94, T95, T97 y T98. Calle 5, cepa 239KH89. Calle 6, control negativo (*afa-8*, 302 pb). Calle 7, marcador de ADN (100-1000 pb). Calles 8-14: T90, T94, T97, T95 (c1), T95 (c4), T90 (c2) y T90 (c8). Calle 15, cepa 31A. Calle 16, control negativo (*clpG*, 402 pb). Calles 17 y 18: T98 (c6) y T98 (pool 2). Calle 19, cepa EDL933. Calle 20, control negativo (*eae*, 510 pb). Calles 1-2 (fila inferior): cepa EDL 933 y control negativo (*16S rRNA*, 340 pb). Calles 3-7: C 17, C18, C24, C34 y C38. Calle 8, control negativo. Calle 9, cepa FVL16 (*papC*, 328 pb). Calle 10, marcador de ADN (100-1000 pb). Calles 11 y 12: cepas 146N y EDL933. Calle 13, control negativo (*vtx1*, 539 pb). Calles 14 y 15: cepas 146N y 02/02. Calle 16, control negativo (*vtx2*, 358 pb).

El 100% de las muestras obtenidas en terneros de cría para carne ($n = 91$) mostraron crecimiento confluyente con predominio de bacterias L+. El 95% (87/91) de las mismas resultaron positivas para al menos un GV. Las frecuencias relativas de los marcadores genéticos de virulencia se indican a continuación (Fig. 7.3).

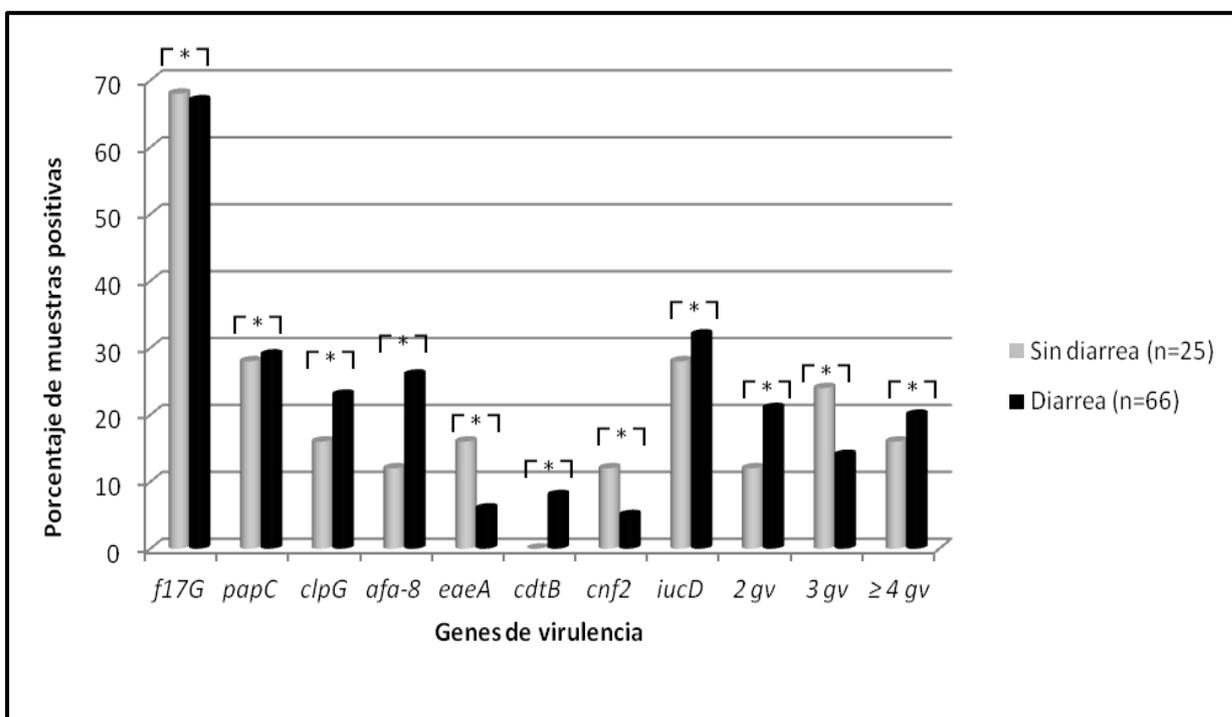


Fig. 7.3. Frecuencias relativas para los GV de *E. coli* en heces de terneros de cría para carne. El símbolo Γ^* indica que las diferencias entre grupos (diarrea vs. sin diarrea) no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$); gv (genes de virulencia).

Al igual que lo observado en tambo, las muestras de terneros de cría resultaron positivas para marcadores genéticos de fimbrias (*f17G*, *clpG* y *papC*), adhesinas afimbriales (*afa-8* y *eae*) y aerobactina (*iucD*). Estos GV suelen hallarse en cepas de *E. coli* pertenecientes a los patotipos SePEC (o tipo-ExPEC) (*f17G*, *clpG*, *papC* y *afa-8*) y EPEC (*eae*). El 67% de las muestras fueron positivas a *f17G* y el 31% de las mismas resultaron positivas para el marcador *iucD* (Fig. 7.3). Además, el gen *papC* (operón *pap*) se detectó en el 29% de los terneros (Figs. 6.3 y 7.3), seguido en orden de frecuencia por *afa-8* (22%) y *clpG* (21%) (Fig. 7.3). Los genes codificantes para las toxinas CNF2 (NTEC2) y CDT (*cdtB*, SePEC o tipo-ExPEC) se detectaron en el 7% y 5% de los terneros, respectivamente (Fig. 7.3). En ninguna muestra se detectaron los genes codificantes de VTs (*vtx1* y *vtx2*, VTEC). Coincidiendo con lo observado en terneros de tambo, todas las muestras fueron negativas para los GV de ETEC (*sta*, *stb*, *eltA*, *f5* y *f41*).

Luego de comparar los dos grupos de terneros de cría (diarreicos, $n = 66$; sin diarrea, $n = 25$), los animales diarreicos mostraron una mayor frecuencia de muestras positivas a *clpG* (CS31A), *afa-8* (AFA-VIII) y *cdtB* (CDT), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). El análisis de las frecuencias relativas de otros GV tampoco mostró diferencias significativas entre ambos grupos. Asimismo, las proporciones de muestras positivas a 2, 3 y 4 o más GV fueron similares entre grupos ($p > 0,05$).

En la Fig. 8.3 se muestra la distribución porcentual de muestras positivas a los distintos marcadores genéticos de virulencia de *E. coli*. En este análisis se compararon los terneros diarreicos de ambos sistemas productivos (tambo vs. cría).

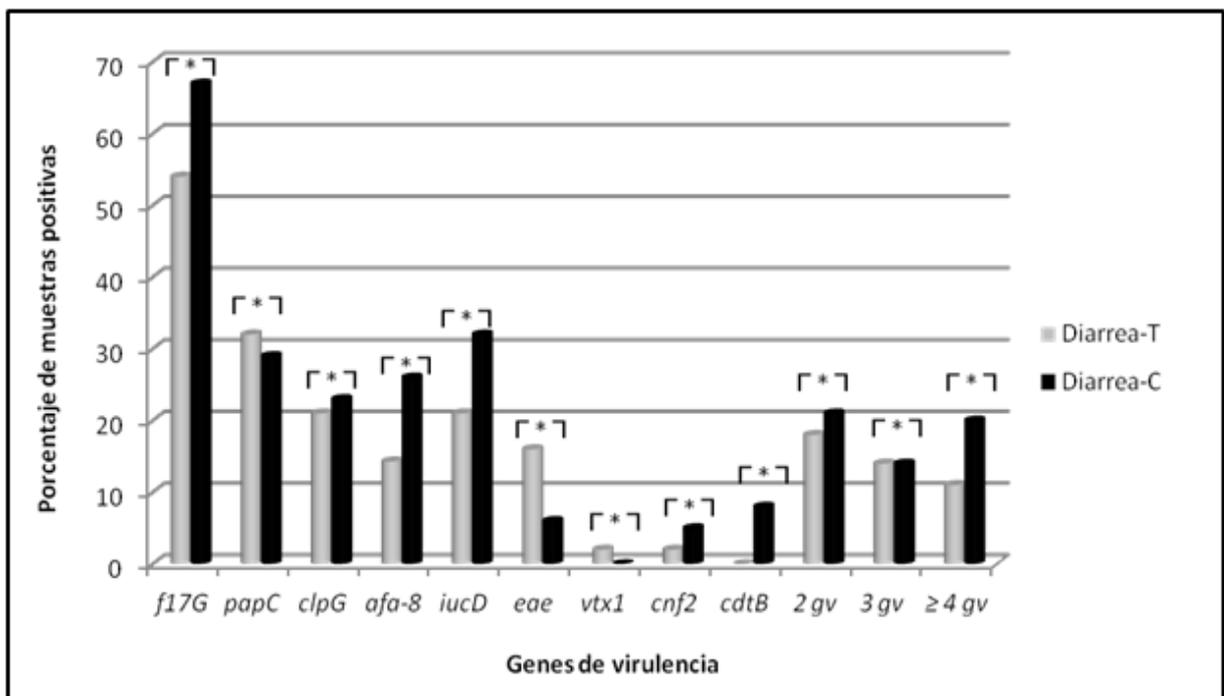


Fig. 8.3. Frecuencias relativas para los GV de *E. coli* en terneros diarreicos de tambo (Diarrea-T) y cría para carne (Diarrea-C). El símbolo (Γ*) indica que las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

La diversidad de genes asociados a virulencia y sus frecuencias relativas mostraron un patrón similar, independientemente del sistema productivo. No obstante, los terneros diarreicos de cría tuvieron mayores porcentajes de muestras positivas para *f17G* (67% vs. 54%), *afa-8* (26% vs. 14,3%) e *iucD* (32% vs. 21%). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). El hallazgo de terneros de cría positivos a *cdtB* resulta interesante, ya que todas las muestras de tambo resultaron negativas. En cambio, la frecuencia de *eae* (intimina) fue menor en los terneros de cría con respecto a los de tambo (6% vs. 16%) (Fig. 8.3).

3.2 Caracterización genotípica de factores de virulencia

3.2.1 Aislamientos de *E. coli* obtenidos de materia fecal en terneros de tambo

El 46% (46/100) de los terneros de tambo tuvieron aislamientos de *E. coli* con al menos un marcador genético de virulencia. Dichos aislamientos presentaron GV correspondientes a fimbrias (*f17G*, *clpG* y *papC*), adhesinas afimbriales (*afa-8* y *eae*), aerobactina (*iucD*) y CNF2 (*cnf2*). En el 29% (29/100) de los terneros se aislaron colonias positivas a *f17G*, ya sea solo o asociado a otros GV. Asimismo, el 10% (10/100) de los animales tuvieron colonias positivas a los genes *clpG* o *papC*, estando ambos en forma individual o combinados con otros GV. En el 6% (6/100) de los terneros se recuperaron colonias positivas para *afa-8*, aunque este marcador de virulencia siempre estuvo asociado a otros GV. Las colonias positivas a *iucD* se identificaron en el 9% (9/100) de los terneros. En cuanto a las toxinas, sólo el 2% (2/100) de los animales tuvieron aislamientos NTEC-2 (*cnf2*⁺). Generalizando, el 16% (16/100) de los terneros presentaron aislamientos positivos a 2 o más GV.

En la Tabla 5.3 se indican las frecuencias relativas de los diferentes genotipos de virulencia de *E. coli* según la condición clínica de los terneros de tambo. La determinación del porcentaje de positividad para cada genotipo se basó en un criterio que evita errores de estimación. Dicho criterio establece que si un ternero presenta colonias con 2 o más genotipos diferentes, ese animal aporta una colonia para cada genotipo en particular, independientemente del número de colonias positivas para cada perfil genético de virulencia (M. Rivas, com. pers.).

Los genotipos encontrados con mayor frecuencia incluyeron: *f17G* (26%, 26/100), *papC* (9%, 9/100), *clpG* (5%, 5/100), *iucD+clpG+afa-8* (4%, 4/100) e *iucD+clpG* (3%, 3/100). Estos determinantes genéticos de virulencia suelen estar presentes en las cepas del patotipo SePEC (o tipo-ExPEC). En cuanto a las toxinas, el 3% (3/100) de los terneros presentaron aislamientos NTEC-2 y no se pudieron recuperar colonias VTEC de ningún ternero. Además, el 14% (14/100) de los animales tuvieron aislamientos de *E. coli* con perfiles genéticos diferentes. Comparando ambos grupos de animales (sin diarrea vs. diarreicos), no se observaron diferencias en las frecuencias relativas de los diferentes genotipos de *E. coli* (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Frecuencias de aislamientos de *E. coli* con distintos perfiles genéticos asociados a virulencia en terneros tambo

Genes de virulencia	Terneros de tambo	
	No. (%) diarreicos (n = 52)	No. (%) sin diarrea (n = 48)
<i>f17G</i>	15 (29)	11 (23)
<i>papC</i>	5 (10)	4 (8)
<i>clpG</i>	4 (8)	1 (2)
<i>iucD</i>	2 (4)	
<i>eae</i>		1 (2)
<i>f17G+ iucD</i>	1 (2)	
<i>f17G+papC</i>	1 (2)	1 (2)
<i>f17G+cnf2</i>		1 (2)
<i>f17G+ clpG</i>	1 (2)	
<i>iucD +clpG</i>	1 (2)	2 (4)
<i>iucD +afa-8</i>	1 (2)	1 (2)
<i>papC+afa-8</i>	1 (2)	
<i>papC+clpG</i>	1 (2)	
<i>clpG+eae</i>	2 (4)	
<i>clpG+afa-8</i>	1 (2)	1 (2)
<i>f17G+ iucD +afa-8</i>	1 (2)	
<i>f17G+ iucD +cnf2</i>		1 (2)
<i>f17G+ clpG+afa-8</i>	1 (2)	
<i>iucD +clpG+afa-8</i>	1 (2)	3 (2)
<i>f17G+iucD +papC+cnf2</i>		1 (2)

A partir de los pooles de colonias se analizaron un total de 414 aislamientos de *E. coli*. El 80% (330/414) de los mismos presentaron al menos un GV. La caracterización genotípica de las colonias se detalla en la Tabla 6.3. El gen *f17G* fue el más prevalente y se identificó en el 48% (199/414) de los aislamientos. La mayoría de las colonias positivas a *f17G* (79%, 157/199) no presentaron GV asociados. Otros marcadores genéticos de importancia incluyeron *clpG* (18%, 75/414) e *iucD* (18%, 74/414), los cuales se presentaron solos o combinados con otros GV. La caracterización genotípica permitió confirmar que el 23,7% (98/414) de las colonias presentaron 2 o más GV correspondientes al patotipo SePEC (o tipo-ExPEC). En esta última categoría se incluyeron los aislamientos NTEC-2 (*cnf2*⁺) (4,5%, 19/414), los cuales también tuvieron marcadores genéticos de fimbrias (*f17G* y *papC*) y aerobactina (*iucD*). No se observaron diferencias en las frecuencias de colonias positivas a 2 o más GV en función de la condición clínica de los terneros de tambo.

Tabla 6.3. Patrones de marcadores genéticos de virulencia en aislamientos de *E. coli* obtenidos de materia fecal en terneros de tambo

Genes de virulencia	Colonias de <i>E. coli</i> (n = 414)	
	No.	%
<i>f17G</i>	157	37,9
<i>iucD</i>	11	2,7
<i>papC</i>	35	8,5
<i>clpG</i>	28	6,8
<i>eae</i>	1	0,2
<i>f17G+iucD</i>	2	0,5
<i>f17G+papC</i>	6	1,4
<i>f17G+cnf2</i>	9	2,2
<i>f17G+ clpG</i>	3	0,7
<i>f17G+iucD+afa-8</i>	5	1,2
<i>f17G+iucD +cnf2</i>	3	0,7
<i>f17G+clpG+afa-8</i>	7	1,7
<i>f17G+ iucD+papC+cnf2</i>	7	1,7
<i>iucD+clpG</i>	10	2,4
<i>iucD+afa-8</i>	11	2,7
<i>iucD+clpG+afa-8</i>	25	6,0
<i>papC+afa-8</i>	1	0,2
<i>papC+clpG</i>	1	0,2
<i>clpG+eae</i>	3	0,7
<i>clpG+afa-8</i>	5	1,2
Total	330	79,7

3.2.2 Aislamientos de *E. coli* obtenidos de materia fecal en terneros de cría para carne

El 80% (64/80) de los terneros de cría tuvieron aislamientos de *E. coli* positivos para al menos un GV y prevalecieron aquellos que codifican fimbrias (*f17G*, *clpG* y *papC*), adhesinas afimbriales (*afa-8*), aerobactina (*iucD*) y toxinas (*cnf2* y *cdtB*). El 67,5% (54/80) de los terneros presentaron colonias positivas a *f17G* (solo y combinado). Asimismo, el 21% (15/80) de los animales tuvieron aislamientos positivos a *papC* (solo y combinado) y el 11% (9/80) presentó colonias positivas a *clpG* (solo y combinado). En el 21% (17/80) de los terneros se aislaron colonias portadoras de *afa-8* y la mayoría de ellas tuvo otros GV asociados. Los aislamientos portadores de *iucD* se detectaron en el 20% (16/80) de los terneros (solo o combinado). En cuanto a las toxinas, el 6% (5/80) de los animales tuvieron aislamientos NTEC-2 y el 2,5% (2/80) presentó colonias positivas a *cdtB*. Generalizando, el 39% (31/80) de los terneros de cría presentaron colonias de *E. coli* portadoras de 2 o más marcadores genéticos de virulencia.

Las frecuencias relativas de los genotipos de virulencia de *E. coli* en función de la condición clínica de los terneros de cría se detallan a continuación (Tabla 7.3). El criterio utilizado para establecer el porcentaje de positividad de cada genotipo fue el mismo que el empleado en los terneros tambo.

Tabla 7.3. Frecuencias de aislamientos de *E. coli* con diferentes perfiles genéticos asociados a virulencia en terneros de cría para carne

Genes de virulencia	Terneros de cría para carne (n = 80)	
	No. (%) diarreicos (n = 59)	No. (%) sin diarrea (n = 21)
<i>f17G</i>	27 (46)	11 (52)
<i>iucD</i>	2 (3,4)	
<i>papC</i>	5 (8,5)	1 (4,7)
<i>clpG</i>	2 (3,4)	
<i>cnf2</i>		2 (9,5)
<i>cdtB</i>	1 (1,7)	
<i>f17G+iucD</i>	2 (3,4)	2 (9,5)
<i>f17G+papC</i>	4 (7)	1 (4,7)
<i>f17G+cnf2</i>		2 (9,5)
<i>f17G+cdtB</i>	1 (1,7)	
<i>f17G+afa-8</i>	2 (3,4)	1 (4,7)
<i>f17G+iucD+papC</i>	2 (3,4)	
<i>f17G+iucD+cnf2</i>	2 (3,4)	1 (4,7)
<i>f17G+iucD+afa-8</i>	1 (1,7)	1 (4,7)
<i>f17G+ iucD+papC+afa-8</i>	1 (1,7)	
<i>f17G+ iucD+clpG+afa-8</i>	2 (3,4)	
<i>f17G+ iucD+cdtB+cnf2</i>	1 (1,7)	
<i>f17G+papC+clpG+afa-8</i>	1 (1,7)	
<i>f17G+papC+afa-8</i>	1 (1,7)	
<i>f17G+clpG+afa-8</i>	2 (3,4)	
<i>iucD+papC</i>	2 (3,4)	
<i>iucD+clpG</i>	1 (1,7)	
<i>iucD+afa-8</i>		1(4,7)
<i>iucD+clpG+afa-8</i>	1 (1,7)	
<i>iucD+papC+clpG+afa-8</i>	2 (3,4)	
<i>papC+clpG+afa-8</i>	3 (5)	
<i>papC+afa-8</i>	4 (7)	
<i>clpG+afa-8</i>	3 (5)	
<i>cnf2+cdtB</i>	1 (1,7)	
<i>afa-8</i>	1 (1,7)	

Coincidentemente con lo observado en tambo, los terneros de cría presentaron aislamientos de *E. coli* cuyos GV suelen identificarse en el patotipo SePEC (o tipo-ExPEC). Los genotipos más prevalentes en estos animales incluyeron: *f17G* (47,5%, 38/80), *papC* (7,5%, 6/80), *f17G+papC* (6%, 5/80) y *f17G+iucD* (5%, 4/80) (Tabla 7.3). Los terneros de cría presentaron un mayor porcentaje de aislamientos positivos a *f17G* con respecto a los de tambo (47,5% vs. 26%). En cuanto a las toxinas, el 2,3% (2/80) de los terneros de cría tuvieron colonias *cdtB*⁺ y *cnf2*⁻. Luego de comparar ambos grupos de terneros de cría (diarreicos vs. sin diarrea), se observó una tendencia a que los terneros diarreicos presenten un mayor porcentaje de aislamientos de *E. coli* con 2 o más GV (Tabla 7.3).

A partir de los pools de colonias se analizaron un total de 604 aislamientos de *E. coli*. El 86% (521/604) de los mismos presentaron al menos un GV. Las colonias obtenidas en terneros de cría mostraron una mayor heterogeneidad en cuanto a las combinaciones de GV. Los marcadores genéticos de fimbrias (*f17G*, *afa-8* y *papC*) y de la aerobactina (*iucD*) se detectaron con mayor frecuencia. El gen *f17G* fue el más prevalente y se identificó en el 65% (394/604) de las colonias (solo y combinado). Sin embargo, la mayoría las colonias positivas a *f17G* (60,6%, 239/394) no presentaron otros GV asociados. Otros marcadores genéticos de relevancia en las colonias incluyeron: *afa-8* (23%, 138/604), *papC* (22%, 134/604) e *iucD* (18,4%, 111/604), los cuales se presentaron solos y combinados (Tabla 8.3).

La caracterización genotípica permitió confirmar que el 38% (232/604) de los aislamientos presentaron 2 o más GV correspondientes al patotipo SePEC (o tipo-ExPEC), entre los cuales también se incluyeron los aislamientos NTEC-2 (Tabla 8.3). El porcentaje de colonias positivas a 2 o más GV fue mayor al observado en las colonias aisladas de terneros de tambo (38% vs. 23,7%). El patotipo NTEC-2 representó el 5,2% (32/604) de las colonias (Tabla 8.3) y esta frecuencia fue muy similar a la observada en las colonias obtenidas de terneros de tambo (4,5%, 19/414) (Tabla 6.3). Diferenciando el origen de las colonias según la condición clínica de los terneros de cría, las colonias positivas a 2 o más GV fueron más frecuentes entre los aislamientos de terneros diarreicos (49,5%, 191/386) con respecto a los aislamientos de terneros sin diarrea (31%, 42/135) y esta diferencia fue significativa ($p < 0,05$).

Tabla 8.3. Patrones de genes asociados a virulencia en aislamientos de *E. coli* obtenidos de materia fecal en terneros de cría para carne

Genes de virulencia	Colonias de <i>E. coli</i> (n = 604)	
	No	%
<i>f17G</i>	239	39,6
<i>iucD</i>	5	0,8
<i>papC</i>	32	5,3
<i>clpG</i>	2	0,3
<i>cnf2</i>	5	0,8
<i>cdtB</i>	5	0,8
<i>f17G+iucD</i>	17	2,8
<i>f17G+papC</i>	29	4,8
<i>f17G+cnf2</i>	6	1,0
<i>f17G+cdtB</i>	2	0,3
<i>f17G+afa-8</i>	23	3,8
<i>f17G+iucD+papC</i>	10	1,7
<i>f17G+iucD+cnf2</i>	12	2,0
<i>f17G+iucD+afa-8</i>	11	1,8
<i>f17G+papC+afa-8</i>	3	0,5
<i>f17G+ clpG+afa-8</i>	13	2,2
<i>f17G+ iucD +papC+afa-8</i>	10	1,7
<i>f17G+ iucD +clpG+afa-8</i>	6	1,0
<i>f17G+ iucD +cnf2+cdtB</i>	8	1,3
<i>f17G+papC+clpG+afa-8</i>	5	0,8
<i>iucD +papC</i>	9	1,5
<i>iucD +clpG</i>	1	0,2
<i>iucD +afa-8</i>	8	1,3
<i>iucD +clpG+afa-8</i>	6	1,0
<i>iucD +papC+clpG+afa-8</i>	8	1,3
<i>papC+afa-8</i>	20	3,3
<i>papC+clpG+afa-8</i>	8	1,3
<i>clpG+afa-8</i>	16	2,6
<i>cnf2+cdtB</i>	1	0,2
<i>afa-8</i>	1	0,2
	521	86,3

3.3 Aislamientos bacterianos y genes de virulencia de *E. coli* en terneros con septicemia

En los terneros de tambo con signos clínicos de septicemia y meningitis se aisló *E. coli* a partir de diferentes muestras: T1 (cerebro e intestino), T2 (cerebro, hígado y bilis), T3 (pulmón y bazo), T4 (bazo, hígado e intestino), T7 (pulmón, bazo, riñón, cerebro, linfonódulo mesentérico y líquido sinovial), T8 (bazo) y T9 (hisopado nasal). Asimismo, los animales T5 y T6 presentaron infecciones polimicrobianas. En el ternero T5 se aislaron *Klebsiella pneumoniae* de cerebro y *E. coli* de pulmón, mientras que en el ternero T6 se aislaron *Proteus* spp. y *Pseudomona aeruginosa* de cerebro y *E. coli* de bilis. Todas las muestras cultivadas para *Salmonella* resultaron negativas y en ninguna muestra de cerebro se pudo aislar *Listeria*.

A partir de los 9 terneros enfermos se evaluaron un total de 185 colonias de *E. coli*. El 90% (166/185) de las mismas resultaron positivas para 1 o más genes asociados a virulencia. Estas colonias mostraron una gran heterogeneidad en sus perfiles genéticos de virulencia (Tabla 9.3 y Fig. 14.3). Algunos aislamientos mostraron combinaciones de 3 o 4 GV, mientras que otros aislamientos tuvieron 1 GV. Esta diversidad genética se observó no sólo en las colonias obtenidas de diferentes muestras de un mismo ternero, sino también en las colonias aisladas a partir de una misma muestra. Los aislamientos de bazo, hígado y bilis mostraron la mayor heterogeneidad en sus genotipos de virulencia (Tabla 9.3).

El 84% (139/166) de los aislamientos de *E. coli* presentaron *iucD* (aerobactina). Sin embargo, sólo el 19% (32/166) de las colonias tuvieron *iucD* como único marcador genético de virulencia. El 81% (134/166) de los aislamientos presentaron genes asociados a fimbrias (Pap, CS31A y F17) o a la adhesina afimbrial AFA-VIII. El gen *papC* (operón *pap*) fue el más prevalente (39,2%, 65/166), seguido en orden de frecuencia por los genes codificantes para las adhesinas de AFA-VIII (*afa-8*) (28%, 46/166), CS31A (*clpG*) (26%, 43/166) y F17 (*f17G*) (22%, 36/166). El 93,8% (46/49) de las colonias positivas a *clpG* también presentaron *iucD*, existiendo una asociación evidente entre ambos GV.

Tabla 9.3. Perfil de genes de virulencia en aislamientos de *E. coli* septicémica (tipo-ExPEC)

Genes de virulencia	No. aislamientos	Muestra (ternero)
<i>f17G+papC+afa-8+iucD</i>	4	Cerebro (T1)
	3	Hígado (T2)
	(2) (4)†	Bazo, intestino (T4)
<i>f17G+papC+clpG+iucD</i>	1	LNМ (T7)
<i>f17G+afa-8+iucD</i>	2	Cerebro (T1)
	1	Bilis (T2)
	1	Hígado (T4)
<i>papC+afa-8+iucD</i>	2	Cerebro (T1)
	(1) (4)†	Bilis (T2) (T6)
	(2) (3) (3)	Bazo, hígado, intestino (T4)
<i>f17G+papC+iucD</i>	(3) (3)	Hígado (T2) (T4)
	1	Bazo (T3)
<i>papC+clpG+iucD</i>	(1) (2)	Bazo (T3)(T8)
	4	LNМ (T7)
<i>clpG+afa-8+iucD</i>	3	Pulmón (T3)
<i>f17G+clpG+iucD</i>	1	Bazo (T3)
<i>f17G+ papC+clpG</i>	1	Bazo (T3)
<i>f17G+iucD</i>	1	Cerebro (T1)
<i>f17G+papC</i>	1	Bazo (T8)
<i>afa-8+iucD</i>	1	Intestino (T1)
	(1) (3)	Hígado, bilis (T2)
	2	Pulmón (T3)
	(1) (3)	Hígado, intestino (T4)
<i>papC+iucD</i>	(1) (1)	Hígado, bilis (T2)
	2	Hígado (T4)
	6	Bazo (T8)
<i>clpG+iucD</i>	1	Bazo (T3)
	(1) (9) (9)	Cerebro, pulmón, bazo (T7)
	(8) (2) (4)	Riñón, LNМ, LSN (T7)
<i>f17G+clpG</i>	2	Bazo (T3)
<i>iucD</i>	(1) (2)	Cerebro, intestino (T1)
	(5) (1) (4)	Cerebro, hígado, bilis (T2)
	1	Bilis (T6)
	(9) (1) (6) (2)	Cerebro, bazo, LSN, LNМ (T7)
<i>f17G</i>	1	Intestino (T1)
	(1) (1)	Bazo (T3) (T8)
	2	Bilis (T6)
<i>clpG</i>	(4) (1)	Pulmón, bazo (T3)
	(3)	Bazo (T5)
<i>papC</i>	10	HN (T9)

†El orden en que se dispone la cantidad de aislamientos, entre paréntesis, tiene correspondencia con el ternero o la muestra.

3.4 Resistencia antibiótica en aislamientos de *E. coli* asociados a septicemia

Los 5 aislamientos de *E. coli* obtenidos de cerebro (T1 y T2), pulmón (T3 y T5) y bazo (T4) mostraron multiresistencia frente a 11, 13 y 14 antibióticos de 8 familias (grupos) diferentes (Tabla 10.3). Un aislamiento de cerebro (T2) mostró el mayor espectro de resistencia antibiótica, siendo resistente a cefalosporinas de 3ra. (cefotaxima) y 4 ta. (cefquinoma) generación; este mismo aislamiento sólo mostro sensibilidad frente al florfenicol. Si bien el número de aislamientos evaluados fue reducido, los resultados mostraron poca relación entre la virulencia potencial de los aislamientos, determinada a partir del perfil de GV, y el espectro de resistencia antibiótica.

Tabla 10.3. Relación entre los fenotipos de resistencia antibiótica y los marcadores genéticos asociados a virulencia en aislamientos de *E. coli* obtenidos de órganos

Antibiótico	Muestra y perfil genético del aislamiento				
	Cerebro (T1) <i>fl7G+afa-8+ iucD+papC</i>	Cerebro (T2) <i>iucD</i>	Pulmón (T3) <i>clpG+afa-8+ iucD</i>	Pulmón (T5) <i>clpG</i>	Bazo (T4) <i>fl7G+afa-8+ iucD+papC</i>
AMC 30	R*	R	R	R	R
CL30	R	R	R	R	R
CEF30	R	R	R	R	R
CEC30	R	R	R	R	R
CTX30	S ⁺	R	S	S	S
CEQ30	S	R	R	R	S
GEN10	S	R	S	S	S
S300	S	R	R	R	R
ERY15	R	R	R	R	R
TIL15	R	R	R	R	R
OT30	R	R	R	R	R
ENR5	R	R	R	R	R
FFC30	R	S	R	R	S
S3	R	R	R	R	R
TMS25	R	R	R	R	R

AMC 30 µg (amoxicilina y ácido clavulánico), CL 30 µg (cefalexina), CEF 30 µg (cefalotina), CEC 30 µg (cefaclor), CTX 30 µg (cefotaxima), CEQ 30 µg (cefquinoma), GEN 30 µg (gentamicina), S300 300 µg (estreptomicina), ERY 15 µg (eritromicina), TIL 15 µg (tilmicosina), OT 30 µg (oxitetraciclina), ENR 5 µg (enrofloxacin), FF 30 µg (florfenicol), S3 300 µg (sulfonamida), TMS 25 µg (sulfametazina y trimetoprima); R* (resistente) y S⁺ (sensible).

3.5 Descripción histopatológica de las lesiones en terneros con septicemia

El examen microscópico de los órganos de los terneros (T1-T6) demostró la presencia de lesiones. Este hallazgo fortalece la importancia clínica de los aislamientos bacterianos y establece una posible relación con los casos de septicemia.

En las meninges de los animales T1 y T2 se observó un infiltrado inflamatorio con predominio de neutrófilos, menor cantidad de macrófagos y ocasionales linfocitos (meningitis fibrinosupurativa, difusa y severa) (Figs. 9.3, 10.3 y 11.3). La meningitis afectó el tallo cerebral (incluida la porción inferior del bulbo raquídeo) (T1) (Fig. 9.3), cerebelo (T1) y la corteza cerebral (T2) (Fig. 10.3). También se observó una gran cantidad de neutrófilos con cariorrexis y cariólisis, fibrina (Figs. 9.3, 10.3 y 11.3) y bacterias (T1 y T2) (Fig. 9.3 y 10.3) con morfología compatible con *E. coli* (bacilos rectos gramnegativos, 2,22-2,35 μm) (Fig. 9.3). En la luz del canal endimario de la porción inferior del bulbo raquídeo se apreciaron neutrófilos viables y muertos (cariólisis) junto a material eosinofílico (T1) (Fig. 9.3).

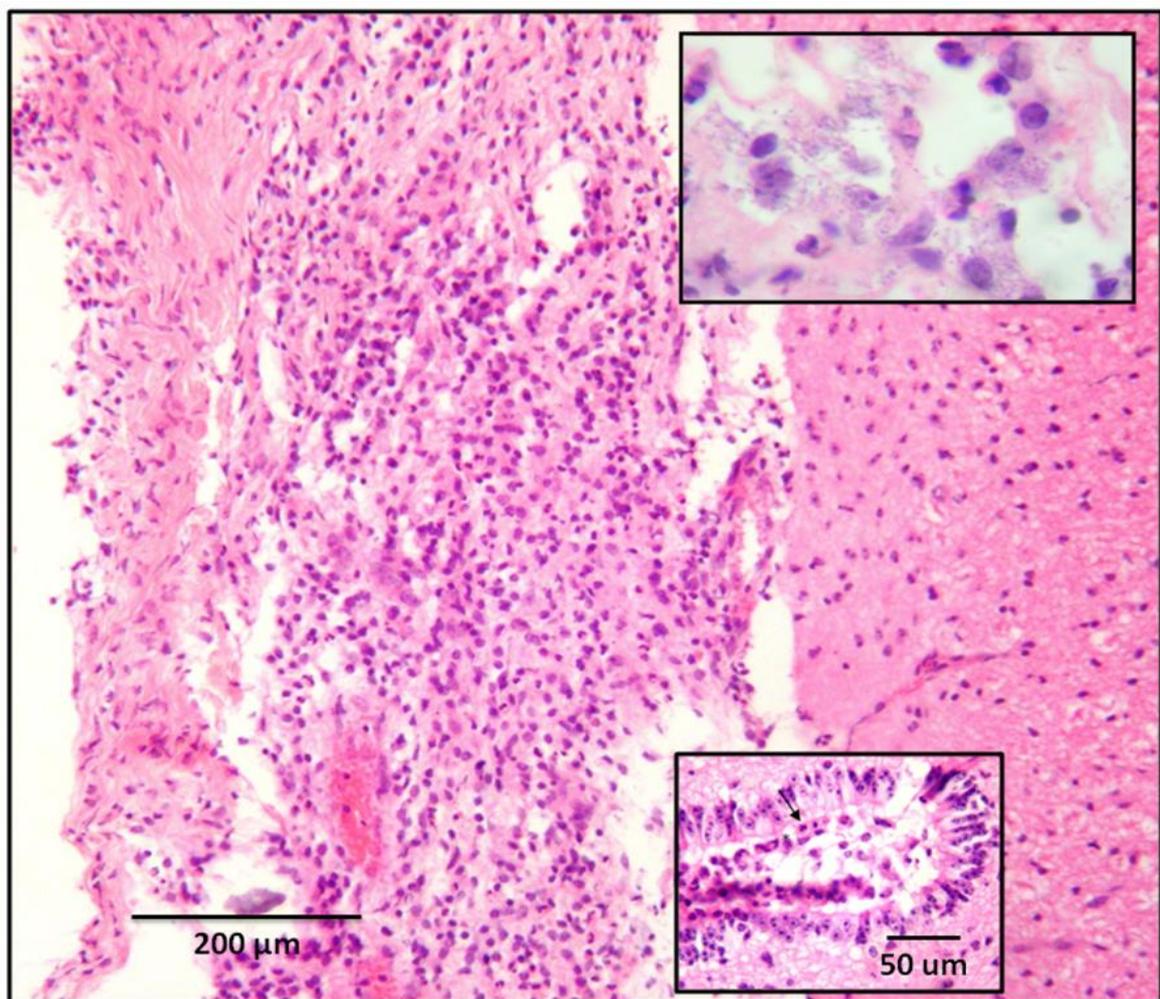


Figura 9.3. Porción inferior del bulbo raquídeo, leptomeninges, ternero (T1). Infiltrado inflamatorio severo y difuso con predominio de neutrófilos, presencia ocasional de macrófagos dispersos y escasos linfocitos. Se observa material eosinofílico y filamentoso (fibrina) (100x). Recuadro superior: exudado meníngeo con bacterias rodeadas de neutrófilos y monocitos (1000x). Recuadro inferior: conducto del epéndimo con presencia de neutrófilos viables (flecha) y muertos (cariólisis), 400x. Tinción de hematoxilina–eosina (H&E).

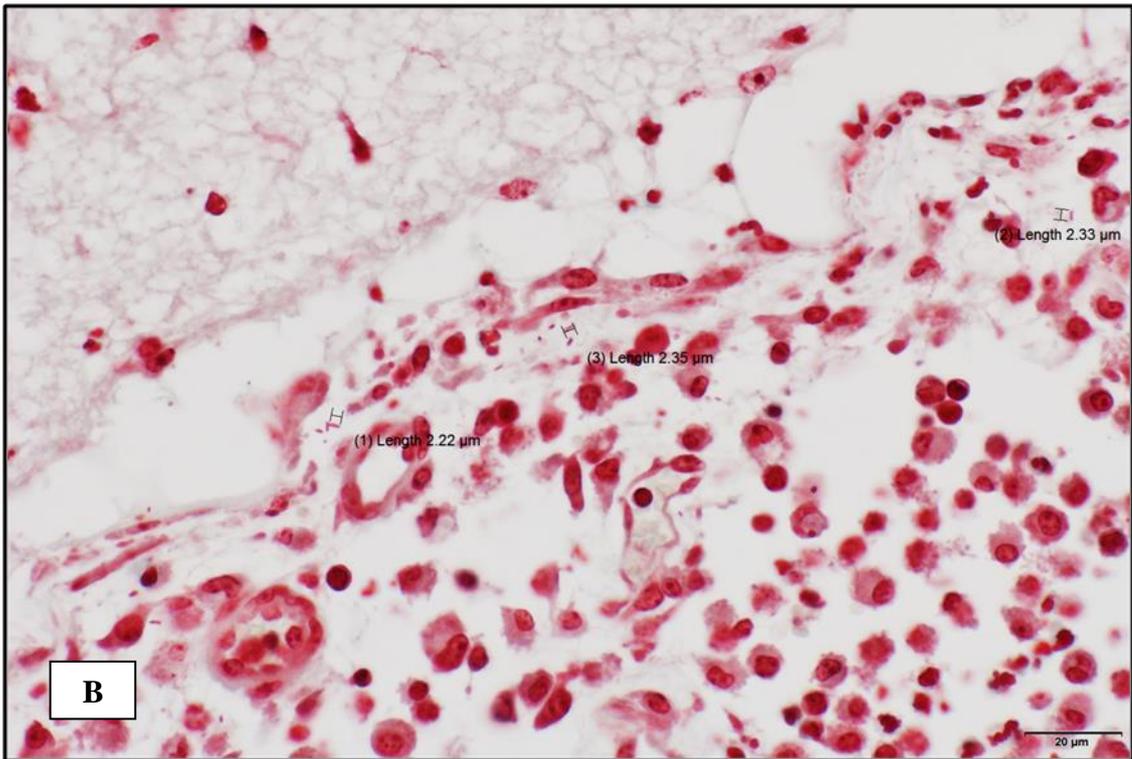
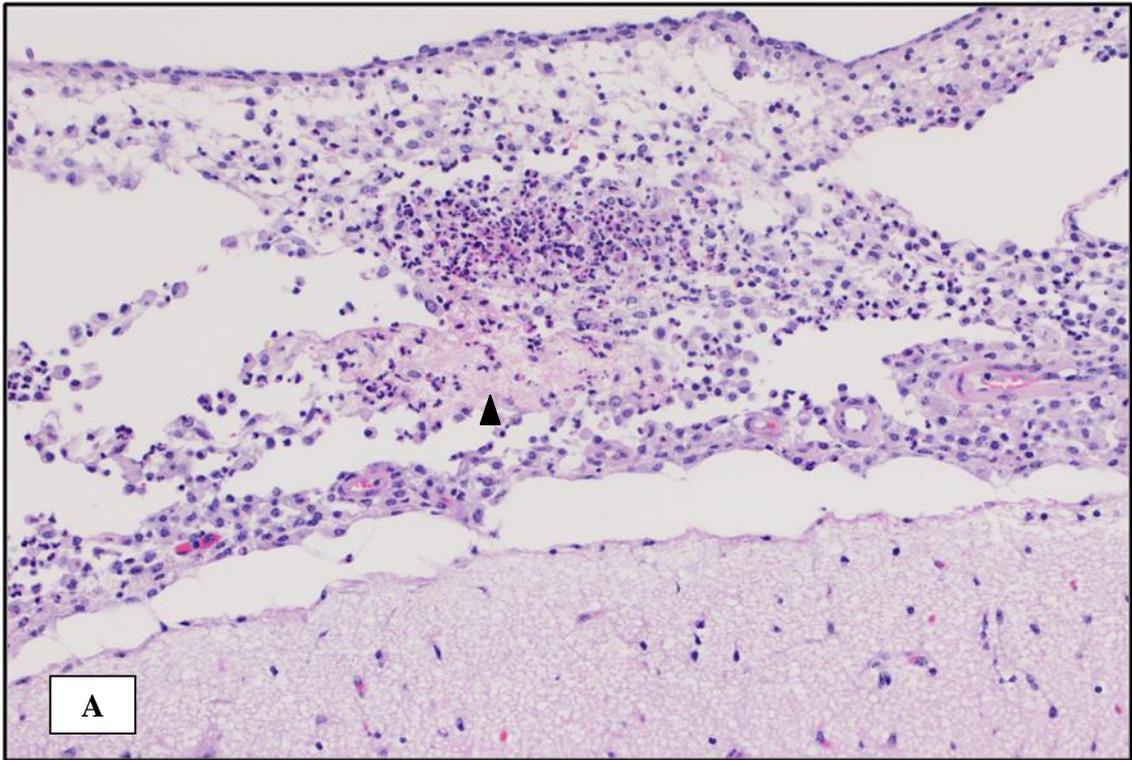


Figura 10.3. Cerebro, leptomeninges, ternero (T2). (A) Meningitis fibrinosa, con predominio de neutrófilos y ocasionales histiocitos. Se observa material eosinofílico y filamentosos (fibrina) (punta de flecha) (200x) (H&E). (B) Bacilos gramnegativos en el infiltrado meníngeo, 600x (tinción de Gram).

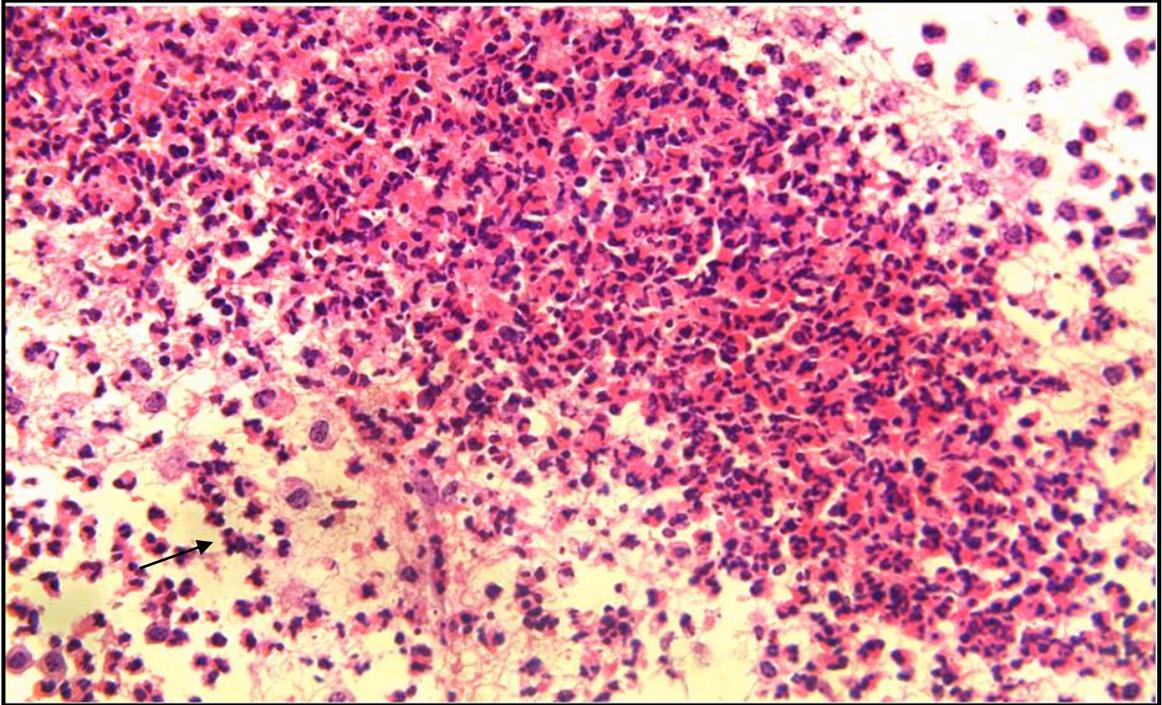


Figura 11.3. Corteza cerebral, leptomeninges, ternero (T2). Exudado fibrinopurulento. Muchos neutrófilos presentan picnosis (flecha) y hay abundante fibrina, 400x (H&E).

Las meninges del tallo cerebral y cerebelo (T1) presentaron hemorragias leves y multifocales. En el parénquima del tallo cerebral había focos escasos y pequeños de infiltrado celular constituido principalmente por neutrófilos y en la porción inferior del bulbo raquídeo se observó un foco de necrosis (T1). Además, en el tallo cerebral y cerebelo (T1) se observó gliosis focal o difusa y satelitosis, ambas de tipo leve. También se observó necrosis ocasional de neuronas y perivasculitis con células endoteliales prominentes (T1). En las muestras de cerebro de T1 y T2 se obtuvieron aislamientos de *E. coli* cuyos perfiles genéticos de virulencia fueron muy distintos (Tablas 9.3, 10.3 y 11.3).

En las meninges del tallo y corteza cerebral del animal T5 se detectó un infiltrado inflamatorio leve, con predominio de linfocitos y ocasionales neutrófilos. Además, se evidenciaron placas de mineralización. En la muestra de corteza cerebral de dicho animal se aisló *Klebsiella pneumoniae*. En el animal T6 se observó una meningitis fibrinosupurativa, difusa y severa con predominio de neutrófilos y macrófagos. En la corteza cerebral se apreció una encefalitis no supurativa, leve y aguda con presencia de focos de gliosis y necrosis con predominio de macrófagos; las células endoteliales presentaron tumefacción. A partir de la corteza cerebral se aisló *Proteus* spp. y *Pseudomona aeruginosa*.

En los hígados de los terneros T1 y T2 se observó congestión moderada centrolobulillar, con extensión a los sinusoides. Los hepatocitos presentaron vacuolización intracitoplasmática leve y aleatoria (T2 y T4). En la sección histológica del hígado de T4 se observaron focos de necrosis (Fig. 12.3) y hemorragias multifocales, moderadas y de distribución aleatoria en el parénquima. Las alteraciones microscópicas de T5 consistieron en infiltrados periportales leves a moderados, con predominio de las células mononucleares (linfocitos y macrófagos) y algunos neutrófilos. Los infiltrados también se observaron en los sinusoides hepáticos (hepatitis periportal mixta). Las lesiones histológicas del animal T6 se caracterizaron por focos de necrosis de diferentes dimensiones y distribuidos aleatoriamente por el parénquima hepático, algunos de ellos asociados con respuesta inflamatoria mixta (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) (hepatitis mixta y necrosis focal) (Fig. 13.3). En las muestras de hígado (T2 y T4) y bilis (T2, T4 y T6) se aislaron colonias de *E. coli* con diferentes perfiles genéticos de virulencia (Tablas 9.3 y 11.3).

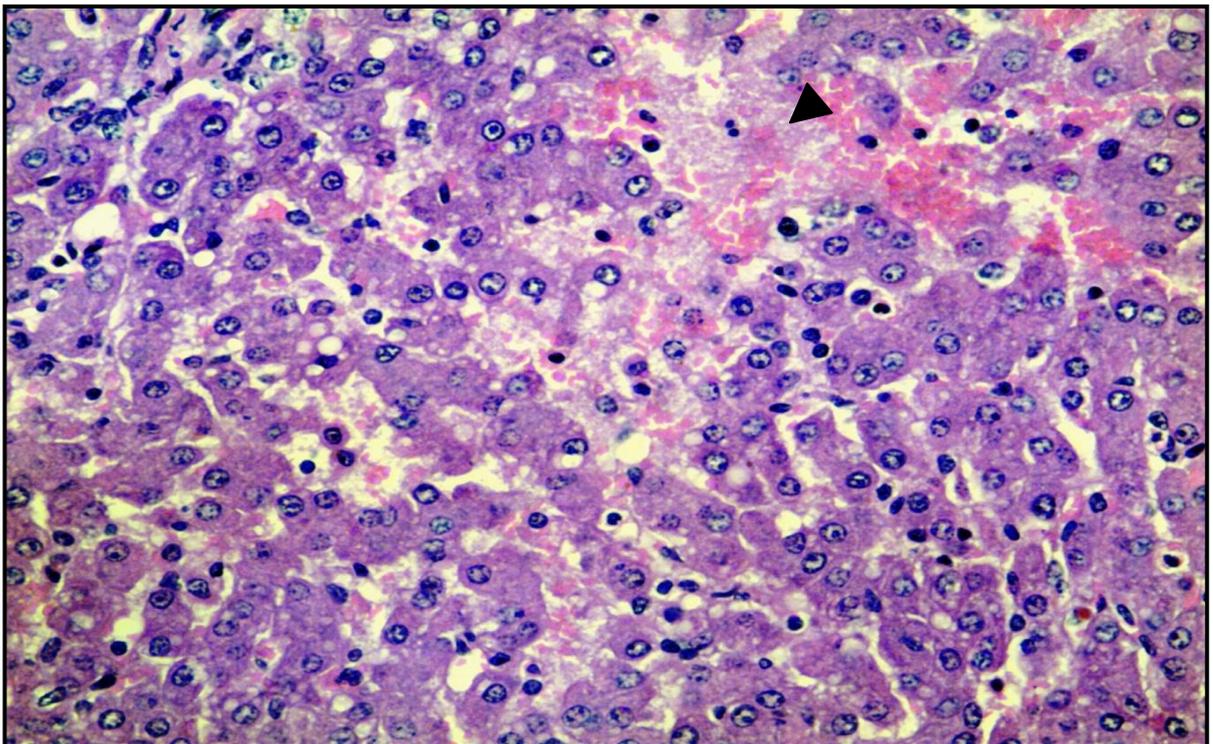


Figura 12.3. Sección histológica de hígado, ternero (T4). Foco de necrosis (punta de flecha) con escasos neutrófilos y linfocitos. Algunos hepatocitos con vacuolización intracitoplasmática, 400x (H&E).

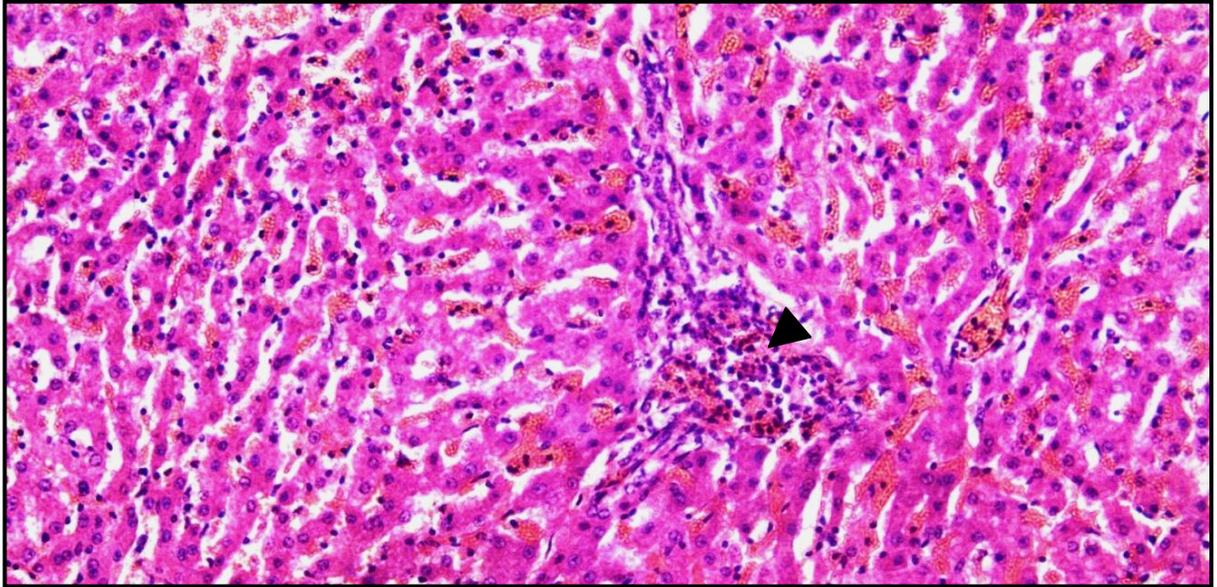


Figura 13.3. Sección histológica de hígado, ternero (T5). Leve infiltrado de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) y neutrófilos en el espacio porta (punta de flecha), 100x (H&E).

En los septos interalveolares de los pulmones (T3 y T5) se observó infiltrado inflamatorio mixto (neutrófilos, macrófagos y linfocitos), moderado a severo, con predominio de neutrófilos (neumonía intersticial mixta, difusa y moderada) (Fig. 14.3). En el pulmón de T4 se detectó marcada congestión y atelectasia. En un lobulillo se observó neumonía intersticial, leve a moderada y no supurativa, con ocasionales neutrófilos. En los bronquiólos se observaron células descamadas y fibrina. Además, se detectaron hemorragias perivasculares y edema multifocal de tipo leve a moderado. En los cultivos de pulmón de los terneros T3, T4 y T5 se aisló *E. coli* y se caracterizó los genes asociados a virulencia en las colonias de T3 y T5 (Tablas 9.3, 10.3 y 11.3).

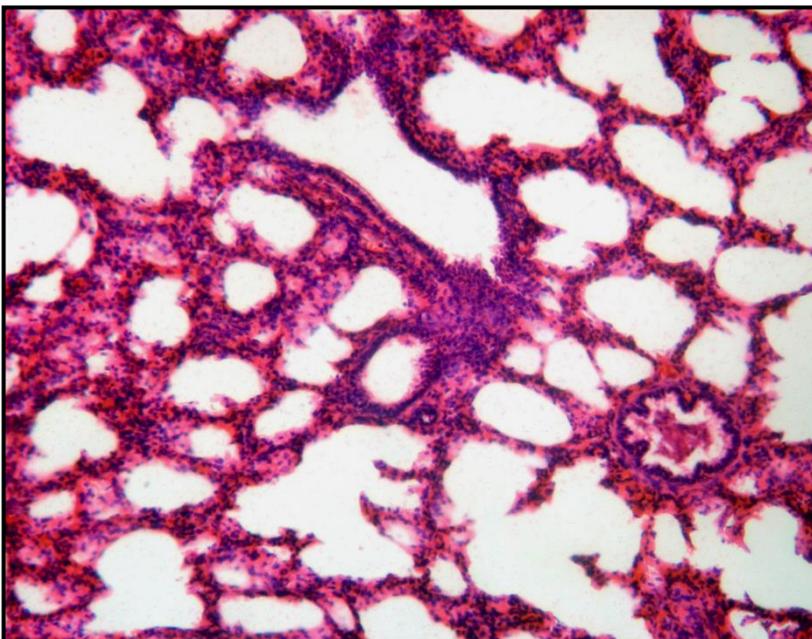


Figura 14.3. Sección histológica de pulmón, ternero (T5). Engrosamiento de los septos interalveolares por la presencia de infiltrado inflamatorio mixto, 100x (H&E).

En la muestra de bazo de T3 se observaron neutrófilos dispuestos alrededor de los folículos linfoides de la pulpa blanca, en algunos de los cuales se detectaron picnosis y carorrexis indicativos de muerte celular (esplenitis supurativa, difusa y moderada) (Fig. 15.3). En la muestra de bazo de T8 no se detectaron lesiones evidentes. Las colonias de *E. coli* aisladas de bazo (T3 y T8) presentaron marcadores genéticos de virulencia (Tablas 9.3, 10.3 y 11.3).

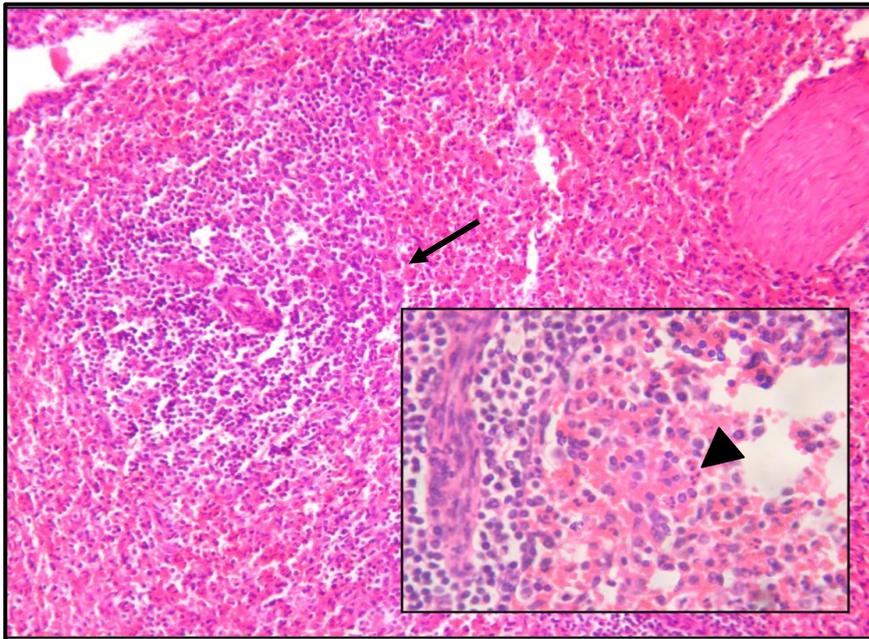


Figura 15.3. Sección histológica de bazo, ternero (T3). Infiltrado con presencia de neutrófilos alrededor de los folículos linfoides (flecha) de la pulpa blanca (100x). Presencia de moderada cantidad de neutrófilos en la pulpa roja que rodea al folículo linfoide (punta de flecha, recuadro inferior), 400x (H&E).

En las secciones histológicas de riñón sólo se observaron lesiones en una (T4) de las cinco muestras (T1, T2, T4, T5, T6) recolectadas para histopatología. Las mismas se caracterizaron por la presencia de neutrófilos y material hialino (rosado y homogéneo) dentro de los túbulos renales, con una distribución focal (tubulonefritis supurativa, focal y leve a moderada) (Fig. 16.3). Ninguna de estas muestras se procesó para cultivo bacteriológico.

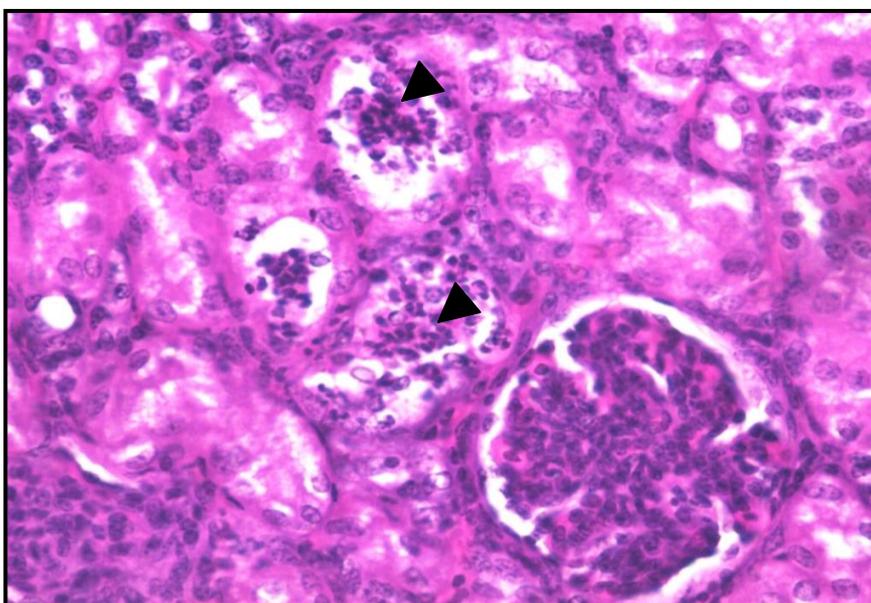


Figura 16.3. Sección histológica de riñón, ternero (T4). Presencia de neutrófilos y material hialino en la luz de los túbulos renales (puntas de flecha), 400x (H&E).

A continuación se indican las relaciones que existieron entre las lesiones histológicas de los órganos y los perfiles genéticos de virulencia de los aislamientos de *E. coli*. Además, se indican las lesiones observadas en otros órganos de los terneros con septicemia (Tabla 11.3).

Tabla 11.3. Perfiles genéticos de virulencia en aislamientos de *E. coli* obtenidos de órganos con lesiones

GV del aislamiento	Animal	Muestra	Lesión asociada	Lesiones en otros órganos
<i>f17G+afa-8+iucD+papC</i> (4) [#]	T1	Cerebro	Meningitis fibrino-supurativa severa	Congestión hepática moderada centrolobulillar y de los sinusoides
<i>iucD</i> (5)	T2	Cerebro	Meningitis fibrino-supurativa severa	
<i>f17G+afa-8+iucD+papC</i> (3) <i>f17G+iucD+papC</i> (3)	T2	Hígado	Congestión moderada centrolobulillar y de los sinusoides	
<i>clpG+afa-8 iucD</i> (3) <i>clpG</i> (4)	T3	Pulmón	Neumonía intersticial mixta, difusa y moderada	Pericarditis mononuclear leve y hemorragia epicárdica
<i>f17G+clpG</i> (2)	T3	Bazo	Esplenitis supurativa, difusa y moderada	Hemorragia multifocal y trombosis en la base cerebral
<i>f17G+iucD+papC</i> (3) <i>afa-8+iucD+papC</i> (3)	T4	Hígado	Necrosis y hemorragia multifocal moderada a severa	Tubulonefritis supurativa multifocal leve a moderada
<i>clpG</i> (3)	T5	Pulmón	Neumonía intersticial mixta, difusa y moderada	Meningitis mononuclear muy leve en cerebro (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) Hepatitis periportal mixta leve a moderada. Congestión centrolobulillar y de los sinusoides
<i>afa-8+iucD+papC</i> (4)	T6	Bilis	Necrosis y hepatitis multifocal mixta	Meningitis fibrino-supurativa severa en cerebro (<i>Proteus</i> spp. y <i>Pseudomona aeruginosa</i>) Bronconeumonía supurativa, moderada y neumonía intersticial moderada no supurativa

[#] Indica el número de colonias obtenido en cada muestra para cada genotipo de *E. coli*.

3.6 Comparación de los perfiles de genes de virulencia en aislamientos de *E. coli*

La Fig. 17.3 muestra la correspondencia existente entre los marcadores genéticos de virulencia de *E. coli*. Para este análisis se incluyeron colonias aisladas de órganos o fluidos corporales (Muestra, columna izquierda) y aislamientos obtenidos de materia fecal (Muestra, columna de derecha). Los perfiles genéticos de virulencia en los aislamientos de ambos tipos de muestras coincidieron y correspondieron al patotipo SePEC (tipo-ExPEC). Los genotipos más prevalentes incluyeron: i) *clpG+iucD*, ii) *afa-8+iucD*, iii) *iucD* y iv) *clpG*.

Muestra	No.	Genes de virulencia						No.	Muestra
		<i>f17G</i>	<i>clpG</i>	<i>papC</i>	<i>afa-8</i>	<i>iucD</i>	<i>cnf2</i>		
Cr (4) Bz (2) Hg (3) In (4)	13							10	Mf
Lm (1)	1							7	Mf
Cr (2) Bz (2) Hg (3) Bl (5) In (3)	15							16	Mf
Cr (2) Hg (1) Bl (1)	4							10	Mf
Bz (1) Hg (6)	7							31	Mf
Bz (1)	1							20	Mf
Bz (1)	1							15	Mf
Pm (3)	3							3	Mf
Bz (3) Lm (4)	7							35	Mf
Bz (2)	2							14	Mf
Bz (1)	1							11	Mf
Cr (1) Pm (9) Bz (10) Rñ (8) Ls (4) Lm (2)	34							21	Mf
Pm (7) Bz (1)	8							1	Mf
Pm (2) Hg (2) Bl (3) In (4)	11							30	Mf
Bz (6) Hg (3) Bl (1)	10							21	Mf
Cr (1)	1							19	Mf
Cr (15) Bz (1) Hg (5) Bl (1) In (2) Ls (6) Lm (2)	32							9	Mf
Bz (2) Bl (2) In (1)	5							19	Mf
Hn (10)	10							11	Mf
Total	166							766	

Fig. 17.3. Genes de virulencia en colonias de *E. coli* obtenidas de órganos y fluidos corporales (Muestra, columna izquierda) o de materia fecal (Muestra, columna derecha). El número de colonias (No.) con los perfiles de virulencia más frecuentes se indican en negrita y con recuadro gris. La presencia de cada gen de virulencia se indica con recuadros en gris oscuro. Abreviaturas: Bl (bilis), Bz (bazo), Cr (cerebro), Hg (hígado), Hn (hisopado nasal), In (intestino), Lm (linfonódulo mesentérico), Ls (líquido sinovial), Pm (pulmón), Rñ (riñón), Mf (materia fecal).

3.7 Infecciones combinadas por rotavirus bovino grupo A (RVA), coronavirus bovino (CoVb) y *E. coli* portador de genes de virulencia

RVA demostró tener una amplia circulación en los establecimientos de cría para carne y tambo. Asimismo, las infecciones por este virus se registraron, aproximadamente, en el 25% de los terneros con diarrea y en el 7% de los terneros sin diarrea. Si bien la caracterización de los GV de *E. coli* no se realizó en la totalidad de los terneros evaluados para RVA y CoVB, resulta interesante estudiar las asociaciones entre estos agentes infecciosos. A continuación (Tabla 12.3) se detallan las infecciones combinadas por RVA, CoVB y *E. coli* portadora de GV.

El 35% (9/26) de los terneros positivos a RVA y CoVB presentaron colonias de *E. coli* cuyos marcadores genéticos de virulencia son coincidentes con aquellos identificados en las cepas SePEC (tipo-ExPEC). Más aún, el ternero de tambo infectado con la cepa G8P[11] de RVA también desarrolló una infección por CoVB y septicemia por *E. coli* positiva a *clpG+iucD*. A partir de la caracterización realizada, también se observó que los terneros infectados con RVA suelen presentar (42%, 11/26) cepas de *E. coli* con el genotipo de virulencia *f17G*⁺ (F17) (Tabla 12.3).

Tabla 12.3. Relación entre genotipos de RVA, infecciones por CoVB y marcadores de virulencia de *E. coli* en terneros de tambo y cría

Muestra	Sistema	Edad ^{&}	Clínica [#]	RVA	Genotipo RVA	CoVB	Genes de virulencia de <i>E. coli</i>	
							Confluencia	Colonias (nro.)
4385-VT	Tambo	4	D/SP	(+)	G8P[11]	(+)	<i>clpG/papC/iucD</i> *	<i>clpG+iucD</i> (39) / <i>iucD</i> (18) / <i>clpG+papC+iucD</i> (4)*
C-LM	Tambo	< 21	D	(+)	G10P[11]	(-)	<i>f17G</i>	<i>f17G</i> (8)
C-DC	Tambo	10	D	(+)	G6(III)/G10P[11]	(-)	<i>f17G</i>	<i>f17G</i> (10)
J-DC	Tambo	30	D	(+)	G10P[11]	(-)	<i>eae/vtx1</i>	(-)
3-PF	Tambo	< 21	D	(+)	G6(IV)P[5+11]	(-)	<i>f17G</i>	<i>f17G</i> (10)
1-SC	Tambo	4	D	(-)		(+)	<i>f17G</i>	(-)
10155-TSIL	Tambo	6	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G/papC/eae/clpG</i>	<i>f17G</i> (5)
3325-TSIL	Tambo	10	D	(+)	G?P[5]	(-)	<i>f17G/papC/eae/clpG/afa-8</i>	<i>clpG+papC+afa-8</i> (1) / <i>papC</i> (9)
3591-TSIL	Tambo	10	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G/papC/eae/clpG/afa-8</i>	<i>f17G+clpG+afa-8</i> (7) / <i>f17G+clpG</i> (3)
2514-TSIL	Tambo	9	D	(+)	G?P[5]	(-)	<i>f17G/papC</i>	(-)
20188M-TSIL	Tambo	10	SD	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G/papC/eae/clpG/afa-8</i>	<i>clpG</i> (7) / <i>eae+clpG</i> (2) / <i>papC</i> (1)
9-DM	Tambo	8	D	(+)	G6(III)P[11]	(-)	<i>papC/eae/clpG</i>	<i>papC</i> (4)
3-ED	Cría	15	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G/papC/iucD</i>	<i>f17G+papC+iucD</i> (8) / <i>f17G+papC</i> (2)
10-ED	Cría	15	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G/clpG/afa-8</i>	<i>f17G+afa-8</i> (10)
13-ED	Cría	15	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G</i>	<i>f17G</i> (5)
20-ED	Cría	21	D	(+)	NA	(-)	<i>eae/iucD/afa-8</i>	(-)
11-LC	Cría	< 30	D	(+)	G6(IV)/G10P[11]	(-)	<i>eae/f17G/clpG/papC</i>	NA
2-LB	Cría	< 30	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G/cnf2</i>	<i>f17G</i> (10)
6-LB	Cría	< 30	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>iucD</i>	<i>iucD</i> (4)
12-LB	Cría	< 30	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G</i>	<i>f17G</i> (5)
13-LB	Cría	< 30	SD	(+)	G6(IV)	(-)	<i>f17G/afa-8/iucD</i>	<i>afa-8+iucD</i> (8) / <i>f17G+iucD</i> (1)
16-LB	Cría	< 30	SD	(+)	NA	(-)	<i>f17G</i>	<i>f17G</i> (10)
24-LB	Cría	< 30	D	(+)	NA	(-)	<i>f17G</i>	<i>f17G</i> (7)
26-LB	Cría	< 30	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G</i>	<i>f17G</i> (10)
35-LB	Cría	< 30	D	(+)	NA	(-)	<i>f17G/iucD</i>	<i>f17G</i> (2)
3-SJR	Cría	5	D	(+)	G6(IV)P[5]	(-)	<i>f17G/clpG/afa-8/iucD</i>	<i>clpG+afa-8+iucD</i> (6) / <i>clpG+iucD</i> (1) <i>f17G+clpG+afa-8+iucD</i> (1) / <i>clpG</i> (1)

[&] Edad expresada en días. [#] Condición clínica (D: diarrea; SD: sin diarrea; SP: septicemia). *Detección de genes asociados a virulencia en órganos y líquido sinovial. NA; no analizado.

4. Discusión

E. coli se establece rápidamente en el intestino de los animales neonatos y forma parte de la microbiota normal del tracto digestivo de los bovinos (Gyles y Fairbrother, 2010; Izzo *et al.*, 2015). La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, es decir que residen en el intestino pero no representan una amenaza para el huésped (Gyles y Fairbrother, 2010). Sin embargo, existen cepas patógenas que poseen factores de virulencia (Mokadi *et al.*, 2005b) involucrados en la patogénesis de las enfermedades (Izzo *et al.*, 2015). Estos factores de virulencia incluyen adhesinas, enterotoxinas y citotoxinas (Izzo *et al.*, 2015) codificadas por genes, los cuales están presentes en las cepas patógenas y ausentes en las no patógenas (Mokadi *et al.*, 2005b). La finalidad de esta tesis fue evaluar los perfiles genéticos de virulencia en aislamientos de *E. coli* obtenidos de terneros diarreicos y sin diarrea o de terneros de tambo con septicemia y meningitis. Para ello se analizaron 19 GV correspondientes a diferentes patotipos de *E. coli* (ETEC, VTEC/EHEC, EPEC, NTEC y SePEC). En nuestro país, hasta el momento, nunca se había realizado un estudio de estas características, ya que se evaluaron 200 especímenes fecales de terneros de tambo y cría para carne en 16 establecimientos de la provincia de Buenos Aires.

En Argentina hay escasa información con respecto al rol de ETEC como causa de diarrea y en cuanto a los atributos de virulencia de las cepas locales. En nuestra investigación se analizaron GV característicos de las cepas ETEC bovinas y porcinas (*f5*, *f41*, *sta*, *stb* y *eltA*), pero todas las muestras resultaron negativas. Este hallazgo indica que ETEC no sería un patotipo frecuente en los terneros con diarrea de nuestra región. Además, estos resultados coinciden con estudios previos realizados en nuestro país (Campero *et al.*, 1985; Bellinzoni *et al.*, 1990; Mercado *et al.*, 2003). En el primero de estos trabajos se analizaron terneros diarreicos de un rodeo de cría del sudeste de la provincia de Buenos Aires (Campero *et al.*, 1985), mientras que en el segundo se evaluaron terneros con diarrea procedentes de 33 tambos y 36 campos de cría ubicados en cinco provincias (principalmente Buenos Aires) (Bellinzoni *et al.*, 1990). En el tercer estudio se evaluaron terneros con diarrea o septicemia (menores a 3 meses) que se encontraban en un radio de 200 km del centro de la provincia de Buenos Aires (Mercado *et al.*, 2003). En ninguno de los terneros evaluados se pudo aislar ETEC, aunque las técnicas de diagnóstico utilizadas en estos trabajos fueron distintas a la empleada en el presente estudio (PCR). En dichas investigaciones se realizó cultivo bacteriológico en agar Minca-Iso (Campero *et al.*, 1985; Bellinzoni *et al.*, 1990; Mercado *et al.*, 2003), seguido por la prueba de aglutinación con antisuero policlonal (Campero *et al.*, 1985; Mercado *et al.*, 2003) o monoclonal (Bellinzoni *et al.*, 1990) específicos para detectar F5 y F41 (Campero *et al.*, 1985;

Bellinzoni *et al.*, 1990; Mercado *et al.*, 2003). El potencial toxigénico se evaluó con el ensayo del ratón lactante (STa) (Campero *et al.*, 1985; Mercado *et al.*, 2003) o por medio de un ELISA (LT) (Campero *et al.*, 1985).

Si bien ETEC parece tener escasa relevancia epidemiológica en nuestro país, algunos estudios describen su aislamiento a partir de terneros con diarrea (Barrandeguy *et al.*, 1988; Cornaglia *et al.*, 1992; González y Moreira, 2014; Picco *et al.*, 2015). Hace más de dos décadas, se aisló ETEC en terneros diarreicos (30%) y sin diarrea (23%) procedentes de tambos ubicados en la cuenca Abasto. La mayoría de los terneros con diarrea y positivos a ETEC se detectaron durante la 1ra. (62%) y 2 da. (24%) semana de vida (Barrandeguy *et al.*, 1988). Unos años después, Cornaglia y cols. identificaron ETEC en terneros con diarrea (1,5%) de un rodeo de cría (Cornaglia *et al.*, 1992). La identificación de ETEC en ambos estudios se basó en el ensayo del ratón lactante (STa) (Barrandeguy *et al.*, 1988; Cornaglia *et al.*, 1992) y en la detección de F5 por IF (Cornaglia *et al.*, 1992) o aglutinación en placa (Barrandeguy *et al.*, 1988). Las discrepancias entre los estudios mencionados también se han observado en otros países. En La Coruña (España), la prevalencia de ETEC en terneros con diarrea fue del 1% (Blanco *et al.*, 1993), mientras que en otro estudio se determinó una prevalencia del 12% en terneros diarreicos de 65 rodeos lecheros (de la Fuente *et al.*, 1998). Es probable que muchos factores sean responsables de las diferencias epidemiológicas observadas, no sólo en un mismo país sino también entre diferentes países.

La edad de los terneros muestreados es un factor que puede influir en la prevalencia de ETEC. Los animales de 1-5 días de vida (de la Fuente *et al.*, 1998; Van Metre *et al.*, 2008) y hasta los 10 días (Haggard, 1995) son muy susceptibles a desarrollar infecciones y diarrea por ETEC. En nuestra investigación, según los registros disponibles en los establecimientos, se muestrearon al menos 58 terneros de tambo y 21 terneros de cría para carne de 2-15 días. Un muestro con más cantidad de terneros y de menor edad podría haber contribuido a la detección de ETEC. Sin embargo, uno de los estudios más importantes del país tampoco pudo identificar ETEC a pesar de haberse evaluado 212 terneros menores a 15 días de vida (de los cuales 36 tenían menos de 5 días) (Bellinzoni *et al.*, 1990). No obstante ello, los aislamientos ETEC descriptos en Argentina se han obtenido, principalmente, en terneros de 10 días o menores (Barrandeguy *et al.*, 1988; Picco *et al.*, 2015). Experimentalmente, los terneros privados de calostro e inoculados con ETEC (O20:K99⁺) desarrollaron diarrea sólo cuando tuvieron menos de 1 día de vida (Tzipori *et al.*, 1981b). Las inoculaciones en terneros de mayor edad (36 h a 26 días) y con diferentes cepas ETEC (O20:K99⁺ y 09:K99⁺) no lograron reproducir la

enfermedad, aunque las cepas se excretaron en la MF (Tzipori *et al.*, 1981b; Snodgrass *et al.*, 1982). A pesar de lo mencionado, el período de susceptibilidad a las infecciones por ETEC puede prolongarse hasta los 15 días de vida (Barrandeguy *et al.*, 1988; de la Fuente *et al.*, 1998) y esto suele observarse cuando ocurren infecciones previas o simultáneas con RV (Tzipori *et al.*, 1981b; Snodgrass *et al.*, 1982; Van Metre *et al.*, 2008; Younis *et al.*, 2009). En relación a ello, un relevamiento realizado en España encontró proporciones similares de infecciones por *E. coli* F5⁺ en terneros de 1-7 días de vida (12,5%), 8-14 (10,5%), 15-21 (14,7%) y 22-30 (6,9%). Sin embargo, el 65% de estos terneros desarrollaron infecciones mixtas con RV y *Cryptosporidium* spp. (de la Fuente *et al.*, 1998).

Las diferencias entre regiones y rodeos (Bellinzoni *et al.*, 1990; Picco *et al.*, 2015), condiciones de manejo (Younis *et al.*, 2009; Picco *et al.*, 2015) y la vacunación de las madres (Younis *et al.*, 2009) también son factores que pueden explicar las diferencias epidemiológicas observadas. La diarrea producida por ETEC se previene mediante la inmunización de las madres y el suministro temprano de calostro a los terneros (Nagy y Fekete, 2005). La inmunización materna con vacunas desarrolladas a partir de extracto crudo de F5 (K99) (Acres *et al.*, 1979; Nagy, 1980; Haggard, 1995) o bacterinas (Acres *et al.*, 1979) aumentaron los títulos de Acs anti-K99 en el suero y calostro (Nagy, 1980), logrando proteger a los terneros (Acres *et al.*, 1979; Nagy, 1980; Haggard, 1995) frente al desafío experimental con las cepas B41 (0101:K99⁺:ST⁺) (Nagy, 1980) y B44 (09:K99⁺:ST⁺) (Acres *et al.*, 1979) luego de la ingesta de calostro. El efecto protector de la vacunación materna se evidenció por una disminución de la mortalidad, incidencia y severidad de la diarrea (Acres *et al.*, 1979; Nagy, 1980). En condiciones naturales, también está demostrado que la vacunación de las madres reduce significativamente la tasa de infección por *E. coli* F5⁺ (Younis *et al.*, 2009).

De acuerdo a la información generada en Argentina por diferentes investigadores y en distintos años, se puede considerar que el patotipo ETEC estaría asociado a diarrea en terneros de temprana edad y con escasa frecuencia (Bellinzoni *et al.*, 1990), aunque podría haber variaciones entre establecimientos o regiones (Barrandeguy *et al.*, 1988; Picco *et al.*, 2015). En relación a los atributos de virulencia de las cepas ETEC locales, nuestro grupo de trabajo caracterizó los GV (PCR y secuenciación) de una cepa bovina, demostrándose que la misma era portadora de *f5*, *f41* y *sta* (González Pasayo y Moreira, 2014). En otro trabajo se identificaron los GV en aislamientos ETEC obtenidos de 39 terneros de tambo (Córdoba). Dichos aislamientos resultaron positivos a *sta* (7,7%), *f5+f17* (5,1%), *f5* (2,6%), *sta+eae* (2,6%),

sta+f5+f41 (2,6%) y *sta+f5+f17* (2,6%) (Picco *et al.*, 2015). Por lo tanto, parece haber cierta diversidad en los genotipos de virulencia de las cepas ETEC locales.

Las cepas AEEC se clasifican en *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (subgrupo de VTEC) y *E. coli* enteropatogénica (EPEC) según su capacidad o no para producir VT, respectivamente (Wales *et al.*, 2005). Los casos de enfermedad ocurridos en forma natural demuestran que ciertas cepas EHEC causan diarrea o disentería en terneros y producen lesiones histopatológicas y de A/E en la mucosa intestinal (Schoonderwoerd *et al.*, 1988; Gunning *et al.*, 2001, Wani *et al.*, 2004; Wani *et al.*, 2005).

En el presente estudio se detectó *vtx1* en las zonas de crecimiento confluyente L+ de los terneros de tambo. Si bien este resultado es de zona confluyente, coincide con lo observado por otros investigadores, quienes indican una mayor frecuencia de *vtx1* en los aislamientos VTEC de terneros (Wieler *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 1997; Orden *et al.*, 1998; Salvadori *et al.*, 2003; Leomil *et al.*, 2003; Mercado *et al.*, 2004; Herrera-Luna *et al.*, 2009). La detección de *vtx* puede utilizarse como un indicador de bovinos portadores de VTEC (Fernández *et al.*, 2009), por lo tanto la frecuencia relativa de VTEC en nuestro estudio fue de 1,8%. Este hallazgo resulta particular, ya que los estudios previos en Argentina indican una mayor circulación de VTEC, no sólo en las muestras analizadas a partir del crecimiento confluyente (Fernández *et al.*, 2009) sino también en aquellas evaluadas desde colonias individuales (Sanz *et al.*, 1998; Mercado *et al.*, 2004). En los estudios mencionados se determinaron frecuencias relativas del 15,8% (12/76) en terneros diarreicos (Mercado *et al.*, 2004), del 26,9% (34/126) en terneros con y sin diarrea (Sanz *et al.*, 1998) y del 43% (108/252) en terneros de tambo sin especificar su condición clínica (Fernández *et al.*, 2009).

La baja frecuencia de *vtx1* y la ausencia de *vtx2* durante este trabajo podría deberse a distintas causas. Por un lado, se describe la pérdida de estos genes al realizarse subcultivos, ya que los mismos se encuentran codificados en bacteriófagos (Karch *et al.*, 1992; Wani *et al.*, 2005; Badouei *et al.*, 2010). También, hay factores importantes que influyen en las frecuencias de los GV correspondientes a VTEC. Entre ellos se destacan el área geográfica donde se encuentran los rodeos, el momento del muestreo (Badouei *et al.*, 2010), la edad y dieta de los animales (Caprioli *et al.*, 2005) o la estación del año (Caprioli *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2009). Por lo tanto, numerosos estudios en otros países indican que las frecuencias relativas de VTEC son menores a las encontradas en Argentina, alcanzando valores del 16,6% (29/174) (Alemania) (Wieler *et al.*, 1992), 12,7% (44/344) (Brasil) (Leomil *et al.*, 2003), 10% (55/546) (Brasil) (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007), 9,7% (India) (Wani *et al.*, 2003), 9% (20/221) (España)

(Orden *et al.*, 1998), 9% (5/55) (Turquía) (Ok *et al.*, 2008) y 6,9% (11/158) (Irán) (Badouei *et al.*, 2010).

En esta investigación, todas las muestras positivas a *vtx1* también resultaron positivas para *eae*. Sin embargo, a pesar de haberse analizado 10 colonias por muestra, no se obtuvieron aislamientos con el genotipo *vt1+eae*. El número de colonias analizadas por muestra positiva estuvo dentro del rango (10-20) recomendado (Wieler *et al.*, 1992; Gioffré *et al.*, 2002), aunque existe una amplia variación en el número de colonias VTEC en las muestras positivas (Wieler *et al.*, 1992) y ello podría explicar nuestros resultados. A pesar de no haberse aislado colonias VTEC (o EHEC), la detección de *eae* en las muestras positivas a *vtx1* coincide con lo observado por otros investigadores. En los terneros, el gen *eae* se detecta con mayor frecuencia en las cepas VTEC positivas a *vtx1* o *vtx1+vtx2* en comparación con aquellas cepas positivas a *vtx2* (Orden *et al.*, 1998; Leomil *et al.*, 2003; Mercado *et al.*, 2004; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008). Los estudios en Argentina indican que las frecuencias del genotipo *eae+vtx1* pueden ser del 73% (35/48) en los aislamientos VTEC de terneros sin diarrea (Sanz *et al.*, 1998) y del 80% (12/15) (Mercado *et al.*, 2004) y 100% (11/11) (Sanz *et al.*, 1998) en los aislamientos VTEC de terneros con diarrea. En otros países, la detección de *eae* en las cepas VTEC es del 41,6% (10/24) (Leomil *et al.*, 2003) y 55,8% (24/43) (Orden *et al.*, 1998), mientras que en los aislamientos EHEC O26 y O111 alcanza el 69% (65/94) (Lee *et al.*, 2008).

En esta tesis, la detección de *vtx* en los cultivos de MF sin el aislamiento de las cepas se considera un diagnóstico presuntivo de VTEC, aunque es válido para identificar reservorios (Scheutz *et al.*, 2001). La proporción de terneros con zonas confluentes positivas a *vtx1* y *eae* (VTEC) fue similar en terneros diarreicos y sanos (2% para ambos). Este hallazgo, sumado a la baja frecuencia de zonas confluentes positivas, no permite establecer una asociación entre su detección y la presencia de diarrea. Sin embargo, otros autores tampoco han encontrado diferencias cuando se compararon terneros enfermos y sanos. En Brasil, la prevalencia de VTEC en terneros de carne con diarrea fue del 12% (31/264) y en terneros sin diarrea del 8,5% (24/282) (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007). En Argentina, Sanz y cols. no hallaron ninguna relación entre la condición clínica de los terneros y la detección de VTEC, siendo su frecuencia similar en terneros sanos (29%; 24/83) y diarreicos (23% 10/43) (Sanz *et al.*, 1998). A pesar de lo mencionado otros estudios demostraron que las cepas VTEC (y EHEC) se detectan con mayor frecuencia en terneros con diarrea (Mohammad *et al.*, 1985; Wieler *et al.*, 1992; Leomil *et al.*, 2003).

Este contexto y los resultados discrepantes entre investigadores enfatizan la necesidad de continuar realizando estudios epidemiológicos para establecer el rol de las cepas EHEC/VTEC en la diarrea y disentería del ternero. Además, un estudio reciente demostró que algunos aislamientos VTEC (*vtx1+eae*) de terneros con diarrea tienen GV característicos del patotipo SePEC (tipo-ExPEC). En dichos aislamientos se detectaron genes codificantes para Pap (14%), F17 (8%), Afa-VIII (6%) y aerobactina (43%). El 22% de los aislamientos positivos a *vtx1* presentaron una o más de las adhesinas mencionadas (Vilte *et al.*, 2012).

Las cepas bovinas con el genotipo *eae*⁺ se denominan EPEC (China *et al.*, 1998; Wani *et al.*, 2007; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007) y diferentes estudios han evaluado su prevalencia en terneros diarreicos y sanos (China *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1999; Wani *et al.*, 2007; Ok *et al.*, 2009) o en terneros con diarrea (Orden *et al.*, 1998; Aidar *et al.*, 2000). Sin embargo, el rol de las cepas EPEC como causa de diarrea en terneros no está definido y en algunos estudios no se ha podido establecer una asociación (Wani *et al.*, 2007; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007).

Durante este trabajo se detectó *eae* en el crecimiento confluyente L+ de los terneros de tambo (14,7%) y de cría para carne (9%). Este hallazgo es similar a los resultados obtenidos con terneros en Turquía (13%) (Ok *et al.*, 2009), España (8,1%) (Orden *et al.*, 1998) y Brasil (3,8%) (2,7%) (Aidar *et al.*, 2000; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007). Sin embargo, la detección de *eae* en dichos estudios se realizó a partir de una selección de colonias y no del crecimiento confluyente, por lo tanto podría haber ciertas diferencias (Sanz, 1999). En cuanto a la relación entre la presencia de *eae* y la condición clínica de los terneros, nuestro trabajo no encontró diferencias entre terneros diarreicos y sin diarrea de tambo (16,1% vs. 13%, respectivamente) y de cría para carne (6% vs. 16%, respectivamente). Sin embargo, merece destacarse que este hallazgo coincide con lo observado por diferentes investigadores (China *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1999; Ok *et al.*, 2006; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007). En tambos de Michigan (EEUU) se observó una mayor frecuencia de aislamientos *eae*⁺ en los terneros sanos con respecto a los diarreicos (40% vs. 20%) ($p = 0,001$) (Holland *et al.*, 1999). Asimismo, durante un estudio realizado en Bélgica, la frecuencia de *E. coli eae*⁺ fue mayor en los terneros sanos (24%; 75/311) comparada con los terneros muertos por diarrea (5%; 15/295) (China *et al.*, 1998). En Brasil, la frecuencia de EPEC fue del 2,6% (7/264) en terneros con diarrea y del 2,8% (8/282) en terneros sin diarrea (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007).

Existen diferentes factores que podrían explicar nuestro hallazgo y el de otros investigadores. En primer lugar, los terneros sanos y muestreados por única vez pueden desarrollar diarrea en los días previos y por lo tanto se mantienen como portadores al momento

del muestreo. Segundo, es factible que los terneros presenten diarrea en días posteriores o inmediatamente después del muestreo. Tercero, el número absoluto y relativo de *E. coli eae*⁺ con respecto al resto de la microbiota bacteriana podría ser relevante. La existencia de un umbral a partir del cual la enfermedad no se desarrolla sería posible. Por lo tanto, un estudio longitudinal resolvería en parte dichos inconvenientes. Un muestreo realizado 2 veces por semana durante las primeras 12 semanas de vida determinó una incidencia de *E. coli eae*⁺ que alcanzó el 66% en terneros diarreicos y el 25% en terneros sin diarrea (China *et al.*, 1998).

El patotipo NTEC está asociado a enfermedades intestinales y extraintestinales, tanto humanos como en animales (Nagy *et al.*, 2005; De Rycke *et al.*, 1990). Las cepas NTEC pueden aislarse de terneros con enteritis y diarrea (Blanco *et al.*, 1988; De Rycke *et al.*, 1990; Pohl *et al.*, 1993; Burns *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2010), de terneros con septicemia (Mainil *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001b; Wu *et al.*, 2010) y de bovinos adultos o terneros sin diarrea (Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998).

Este trabajo de tesis evaluó la presencia de NTEC y su posible rol como causa de diarrea en nuestros sistemas productivos. Los resultados obtenidos permitieron confirmar la excreción de NTEC-2 (*cnf2*⁺) en terneros de tambo y de cría para carne. Esta observación resulta interesante, ya que según la bibliografía consultada (Mercado *et al.*, 2003; Vilte *et al.*, 2012) no se habrían caracterizado molecularmente cepas NTEC-2 locales. El predominio de NTEC-2 coincide con otras investigaciones, las cuales demostraron que los aislamientos NTEC de terneros se caracterizan por producir CNF2, independientemente de la condición clínica (Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001b). Además, ninguna muestra del presente estudio resultó positiva a *cnf1*, lo cual indica que NTEC-1 sería poco frecuente en los terneros de nuestra región. En este sentido, diferentes trabajos demostraron que la frecuencia de NTEC-1 en las heces de terneros o bovinos adultos es mucho menor si se la compara con NTEC-2 (Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998; De Rycke *et al.*, 1999; Orden *et al.*, 1999).

Las frecuencias relativas de NTEC-2 (confluencias *cnf2*⁺) en terneros de tambo (2,8%) y cría (7%) fueron menores a las prevalencias observadas en España (58% y 13,8%) (Blanco *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1999) e Irlanda (23%) (Burns *et al.*, 1996). Sin embargo, en dichas investigaciones se utilizó una metodología diferente. En cada muestra seleccionaron colonias individuales (4 y 10 colonias) y su potencial toxigénico (CNF) se evaluó en cultivos celulares, confirmándose posteriormente por PCR (Blanco *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1999) o seroneutralización (Burns *et al.*, 1996). A pesar de esta diferencia metodológica, la PCR para detección de *cnf* y sus variantes (*cnf1* y *cnf2*) ha demostrado una correlación completa con los

ensayos *in vitro* en cultivos celulares (Blanco *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1999). Por lo tanto, las diferencias epidemiológicas entre los estudios podrían deberse a la edad de los terneros muestreados, las prácticas de manejo, el uso de antimicrobianos (Van Bost *et al.*, 2001b) y las diferencias geográficas. En cuanto a la edad, un trabajo demostró que el riesgo de infección por NTEC-2 aumenta con la edad de los terneros, siendo mayor en los animales de 31-90 días de vida con respecto a los menores de 30 días (Orden *et al.*, 1999). En relación a ello, la mayoría de los terneros muestreados en este trabajo de tesis tenían menos de 30 días de vida. Con respecto a las frecuencias de NTEC-2 en el total de colonias analizadas, los resultados obtenidos en los aislamientos de terneros de tambo (4,5%) y cría para carne (5,2%) fueron totalmente coincidentes con un estudio realizado en Brasil. En el mismo se determinó un 4,5% de colonias NTEC-2 (de 205 colonias) obtenidas a partir de 139 terneros con diarrea menores a 60 días de vida (Salvadori *et al.*, 2003). Más aún, la genotipificación realizada en España indica que el 7,8% (de 3093 colonias) y el 4,4% (de 958 colonias) de los aislamientos corresponden a NTEC-2 (Blanco *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1999).

En cuanto a los atributos de virulencia de NTEC-2, la caracterización realizada nos permitió identificar otros GV asociados. Los aislamientos de terneros de tambo y la mayoría de aquellos obtenidos en terneros de cría presentaron *f17G* (en el 89% de las colonias NTEC-2). Esta observación coincide con otras investigaciones que indican una alta correspondencia entre F17 y CNF2, la cual puede demostrarse en el 50% (Oswald *et al.*, 1991), 52% (Mainil *et al.*, 1999) y 79% (Orden *et al.*, 1999) de los aislamientos NTEC-2. Esta íntima asociación se debe a que los genes codificantes para F17 y CNF2 se ubican en el plásmido Vir (Oswald *et al.*, 1991; el Mazouari *et al.*, 1994); generalmente, este plásmido tiene la variante F17b (el Mazouari *et al.*, 1994; Nagy *et al.*, 2005). Estudios a futuro utilizando un protocolo de PCR múltiple y estandarizado (Bertin *et al.*, 1996b) nos permitirán definir las variantes de F17 en las cepas NTEC-2 locales. La detección de *iucD* (aerobactina) también fue frecuente, ya que la mitad de los aislamientos NTEC-2 de tambo y cría presentaron esta característica. La aerobactina es un atributo de virulencia fundamental para *E. coli* septicémica y suele hallarse en las cepas NTEC-2 aisladas de MF de terneros diarreicos y de sangre u órganos de terneros con septicemia (Oswald *et al.*, 1991; Mainil *et al.*, 1999). El 89% de las cepas NTEC-2 de MF (Oswald *et al.*, 1991) y el 46% de las cepas NTEC-2 asociadas a casos de diarrea o septicemia (Mainil *et al.*, 1999) pueden tener aerobactina. En relación con otros marcadores de virulencia analizados, muy pocos aislamientos NTEC-2 presentaron *cdtB* (CDT) y *papC* (Pap) (todas las cepas fueron de tambo), mientras que ninguno fue positivo para *afa-8* (Afa-VIII). En este sentido, un estudio encontró

muy pocas cepas NTEC-2 positivas a Pap, aunque la presencia de Afa puede demostrarse hasta en el 27,5% de las cepas. La detección de CDT es frecuente en los aislamientos NTEC de MF (57%) y en las cepas NTEC-2 aisladas de terneros con septicemia (100%) (Mainil *et al.*, 1999).

Con respecto al potencial patogénico, este estudio no pudo demostrar ninguna relación clara entre la presencia de diarrea y el aislamiento de NTEC-2. Las frecuencias de detección de *cnf2*, tanto en las confluencias como en las colonias, fueron mayores en los terneros sin diarrea con respecto a los terneros enfermos. Este resultado coincide con lo observado por diferentes autores, los cuales indican que hasta el 50% de los terneros sanos pueden albergar colonias NTEC-2 (Blanco *et al.*, 1993; Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998). Según estas observaciones, algunos autores indican que NTEC-2 forma parte de la microbiota normal del intestino (Blanco *et al.*, 1993) y que su significado en los casos de diarrea es difícil de evaluar (Burns *et al.*, 1996). A pesar de estas afirmaciones, está demostrado experimentalmente que las cepas NTEC-2 aisladas de MF o de sangre cardíaca son capaces de producir diarrea asociada a septicemia en terneros neonatos parcialmente calostrados (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003). Más aún, diferentes investigaciones también identificaron NTEC-2 en muestras de terneros con septicemia (Mainil *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001b). La restricción de calostro y la edad al momento de la infección parecen aumentar la capacidad de NTEC-2 para colonizar el intestino e invadir el torrente sanguíneo. Por lo tanto, las cepas NTEC2 representan patógenos oportunistas que esperan circunstancias favorables, pero esta característica no va en detrimento de su virulencia potencial (Van Bost *et al.*, 2001a).

Un aspecto interesante de la presente investigación fue encontrar un predominio evidente de los GV que caracterizan al patotipo SePEC (o tipo-ExPEC), tanto en las heces de terneros diarreicos como de aquellos sin diarrea. Los GV detectados con mayor frecuencia, en el crecimiento confluyente y en las colonias, incluyeron *f17G* (F17), *papC* (Pap), *afa-8* (AfaE-VIII), *clpG* (CS31A) e *iucD* (aerobactina). Estos resultados son interesantes por diferentes razones. En primer lugar, no son muchos los estudios que han evaluado genes (o factores) de virulencia del patotipo SePEC en aislamientos de origen fecal de terneros con diarrea o enteritis (Bertin *et al.*, 2000; Van Bost *et al.*, 2001b; Mercado *et al.*, 2003; Girardeu *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2004; Wo *et al.*, 2010; Valat *et al.*, 2014); además la mayoría de los estudios sólo evaluaron parcialmente estos GV. Segundo, una proporción importante de los terneros excretaron aislamientos de *E. coli* con dos o más GV en sus heces. Tercero, algunos perfiles genéticos de virulencia en dichos aislamientos coinciden con aquellos identificados en las cepas de *E. coli* asociadas a

septicemia en terneros de tambo. Cuarto, los GV característicos de los patotipos intestinales se detectaron con baja frecuencia (EPEC y VTEC) o no se pudo demostrar su presencia (ETEC).

De acuerdo a la caracterización molecular realizada, se puede confirmar que *f17G* fue el marcador de virulencia más frecuente, ya que se detectó en el 50% y 67% de las muestras de terneros de tambo y cría para carne, respectivamente. Esto destaca su amplia distribución en la población de terneros evaluada. La fimbria F17 permite que la bacteria se adhiera a las células intestinales del ternero (Bertin *et al.*, 1996a) y cordero (Cid *et al.*, 1999). En condiciones naturales es posible que F17 confiera una mayor capacidad para que *E. coli* pueda colonizar la mucosa intestinal y ello explicaría la elevada frecuencia de aislamientos positivos para *f17G*. En este sentido, el 26% de los terneros de tambo y el 48% de los terneros de cría presentaron colonias positivas sólo a *f17G*. En un estudio realizado en Turquía también se observó que los aislamientos de *E. coli* positivos sólo a F17 fueron predominantes y se identificaron en el 27,5% de los terneros (Güller *et al.*, 2008). Considerando la totalidad de las colonias analizadas, el 37,9% y 39,6% de los aislamientos obtenidos en terneros de tambo y cría presentaron *f17G* como único marcador genético de virulencia, respectivamente. Diferentes estudios también indican que F17 es el factor de virulencia más frecuente en las cepas aisladas de terneros. No obstante, las frecuencias relativas de aislamientos positivos sólo a F17 fueron menores o similares a las observadas en el presente estudio: 19,3% (Polonia; Ozek *et al.*, 2000), 14% (Bélgica; Van Bost *et al.*, 2001b), 2,4% (Brasil; Salvadori *et al.*, 2003), 7% (Japón; Shimizu *et al.*, 1987), 8,7% (Vietnam; Nguyen *et al.*, 2011) y 39% (Francia; Valat *et al.*, 2014).

En realidad F17 es una familia de fimbrias que incluye diferentes variantes de la subunidad estructural F17-A (F17a-A, F1b-A, F17c-A, F17d-A, F17e-A y F17f-A) (Le Baouguénec y Bertin, 1999; Bihannic *et al.*, 2014) y de la subunidad de adhesión F17-G (F17-G1, F17-G2 y F17-G3) (Bertin *et al.*, 1996b) (Bihannic *et al.*, 2014). La caracterización molecular realizada no estableció las variantes de las subunidades F17-A y F17-G. Por lo tanto, a futuro sería interesante estudiar dichas variantes en las cepas locales y con esta información se podría decidir su inclusión en las vacunas, como ya se hizo en otros países.

En la presente investigación se evaluó si las frecuencias relativas de los GV del patotipo SePEC (tipo-ExPEC) eran mayores en las heces de terneros diarreicos con respecto a las heces de aquellos sin diarrea. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas. Tampoco se observaron diferencias evidentes entre terneros diarreicos y sin diarrea al comparar las frecuencias de colonias con genotipos de SePEC. Estos resultados pueden tener diferentes interpretaciones.

En animales se considera que ExPEC se encuentra en la microbiota normal del intestino (Gyles y Fairbrother, 2010). En este sentido, un estudio realizado con cerdos demostró que los GV típicos de ExPEC promueven la colonización intestinal pero no son esenciales para la misma. En cambio, los sistemas quelantes del hierro otorgan (*fyuA*, *iroN*, *irp2* e *iucD*) ventajas para la colonización intestinal en aquellos clones que presentan perfiles de GV típicos de ExPEC (Schierack *et al.*, 2008). Por lo tanto, es posible que nuestros aislamientos tipo-ExPEC sean parte de la microbiota intestinal de una cierta proporción de los terneros diarreicos y sin diarrea. Como consecuencia de ello, sería esperable no encontrar diferencias en la detección de GV del patotipo SePEC según la condición clínica de los terneros.

Otra posibilidad es que los terneros control (sin diarrea), al estar en íntimo contacto con animales diarreicos, excreten cepas de *E. coli* con marcadores de virulencia característicos de SePEC, como se ha observado en estudios a campo con cepas positivas a CS31A+ColV (Espinasse *et al.*, 1991). Además, suponiendo que las cepas tipo-ExPEC tuviesen un rol como causa de diarrea, el muestreo realizado por única vez tiene sus limitantes. Los terneros pueden mantenerse como portadores luego de desarrollar la diarrea o también pueden manifestar diarrea luego del muestreo (China *et al.*, 1998). Para resolver estos inconvenientes se puede utilizar un grupo control conformado por terneros de establecimientos sin antecedentes de diarrea en las últimas 3 semanas (Herrera-Luna *et al.*, 2009).

Por otra parte, algunos autores sostienen que los aislamientos con atributos de virulencia tipo-ExPEC pueden causar infecciones intestinales y extraintestinales, o más específicamente que las cepas causantes de diarrea pueden desarrollar infecciones extraintestinales. Basándose en los serogrupos y perfiles de GV, un estudio no pudo diferenciar a un grupo de cepas según su origen (MF de terneros con diarrea y sitios extraintestinales de terneros con septicemia). Algunas cepas extraintestinales y con GV típicos de ExPEC (*papGIII*, *hlyA*, *cnfI*) también presentaron GV asociados a enteritis (*f17c-A*, *clpG*, *astA*) (Girardeu *et al.*, 2003). Un estudio en Alemania evaluó cepas de *E. coli* del serogrupo O78 de terneros con diarrea y demostró que dichas cepas presentaron atributos de virulencia asociados a *E. coli* intestinal (*astA*) y extraintestinal (*fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tia*, *colV*). Por lo tanto, las cepas O78 parecen tener la capacidad de expresar varias propiedades de virulencia y actuarían en forma bifuncional como agentes causales de infecciones intestinales y septicemia (Ewers *et al.*, 2004).

En relación con lo mencionado, los terneros con diarrea suelen desarrollar bacteriemia y septicemia por *E. coli* (Aldridge *et al.*, 1993; Fecteau *et al.*, 1997) y viceversa, los terneros con septicemia pueden manifestar diarrea en los estadios finales de la enfermedad (Besser y Gay,

1995; Fecteau *et al.*, 2009). En general, los terneros con diarrea suelen presentar FTP de Igs (Gay y Besser, 1994; Constable *et al.*, 2004) y bajo esta última condición es más probable que ocurra una bacteriemia (Fecteau *et al.*, 1997; Lofstedt *et al.*, 1999; Constable *et al.*, 2004; Besser y Gay, 1995). Se estima que el 30% de los terneros severamente enfermos y con diarrea desarrollan bacteriemia, siendo su riesgo aún mayor cuando existe FTP (Constable *et al.*, 2004). En este contexto, los hallazgos de esta tesis resultan muy interesantes, ya que el 16% y 39% de los terneros de tambo y cría presentaron aislamientos fecales de *E. coli* con 2 o más GV del patotipo SePEC. Además, muchos aislamientos tuvieron perfiles de GV idénticos a los observados en las cepas asociadas a septicemia en terneros de tambo. Este hallazgo coincide con lo observado por otros investigadores (Van Bost *et al.*, 2001b; Girardeu *et al.*, 2003; Wo *et al.*, 2010). En dichos estudios se demostró que los perfiles de GV de muchas cepas de *E. coli* no permitían diferenciarlas según su origen, es decir si provenían de casos de diarrea o si estaban implicadas en infecciones extraintestinales (Girardeu *et al.*, 2003; Wo *et al.*, 2010). Además, tampoco encontraron diferencias significativas cuando compararon las frecuencias de los GV entre las cepas aisladas de casos diarrea y aquellas asociadas a infecciones extraintestinales (Wo *et al.*, 2010). Similarmente, en nuestro estudio observamos que los aislamientos de intestino y órganos (cerebro o bazo y linfonódulo mesentérico) de dos terneros de tambo con septicemia (T1 y T4) tenían perfiles de GV muy similares o iguales.

Todas estas evidencias indican que existe un riesgo potencial para que los aislamientos tipo-ExPEC de MF o intestino puedan causar bacteriemia o septicemia en terneros. Esto fundamentalmente ocurriría cuando existe una FTP de Igs (Fecteau *et al.*, 1997; Lofstedt *et al.*, 1999; Constable *et al.*, 2004; Besser y Gay, 1995). La FTP parece ser un fenómeno frecuente, ya que el 41% de los terneros de tambo (Gooden, 2008) y el 10-40% de los terneros de carne pueden verse afectados (Larson *et al.*, 2004). En los terneros que no reciben suficientes Igs calostrales, las cepas ExPEC pueden colonizar la mucosa y atravesar la barrera epitelial por pinocitosis o migración transepitelial hacia los linfonódulos mesentéricos (Corley *et al.*, 1977; Gyles y Fairbrother, 2010). También, el daño morfológico del intestino delgado, asociado a las infecciones virales, facilita la invasión sistémica por *E. coli* y otras bacterias intestinales (Constable *et al.*, 2004). En relación a ello, este trabajo de tesis demostró que los terneros positivos a RVA pueden tener aislamientos tipo-ExPEC en la MF. Además, un ternero desarrollo diarrea por RVA (G8P[11]) y CoVB, a la cual se le asoció una septicemia por *E. coli* con diferentes perfiles de GV (*clpG+iucD*, *iucD* y *clpG+papC+iucD*).

En la mayoría de los terneros con cuadro clínico de septicemia y meningitis se obtuvieron aislamientos de *E. coli*, indicando su importancia como causa de la enfermedad. Este hallazgo coincide con lo observado por diferentes investigadores, los cuales demostraron que *E. coli* es la bacteria aislada con mayor frecuencia de terneros con bacteriemia, pudiendo representar el 50-65% de los hemocultivos positivos (Hariharan, *et al.*, 1992; Aldridge *et al.*, 1993; Fecteau *et al.*, 1997; Lofstedt *et al.*, 1999; Kireççi *et al.*, 2010). Además, un estudio evaluó terneros con signología clínica de septicemia y a partir de los mismos se identificó *E. coli* en el 68% de los aislamientos bacterianos obtenidos de muestras de tejidos, las cuales provenían del 67% de los terneros necropsiados (Albridge *et al.*, 1993). Asimismo, un análisis retrospectivo de casos clínicos de meningitis y septicemia en terneros determinó que *E. coli* era la bacteria aislada con mayor frecuencia (69% de los terneros) a partir de muestras de cerebro, meninges y líquido cefalorraquídeo (Green y Smith, 1992). Por lo tanto, *E. coli* es el principal microorganismo responsable de la bacteriemia (Hariharan *et al.*, 1992; Fecteau *et al.*, 1997; Kireççi *et al.*, 2010), septicemia (Albridge *et al.*, 1993; Fecteau *et al.*, 2009; Marchese *et al.*, 2012) y meningitis (Green y Smith, 1992; Fecteau *et al.*, 2009) de los terneros neonatos.

A pesar de la importancia de esta bacteria, algunos terneros presentaron infecciones polimicrobianas (más de un género bacteriano) en las cuales estuvieron involucradas *Klebsiella pneumoniae* (cerebro) y *E. coli* (pulmón) en un ternero y *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* (cerebro) y *E. coli* (bilis) en otro animal. En este sentido, otros estudios también demuestran la ocurrencia de infecciones polimicrobianas en terneros con bacteriemia (Fecteau *et al.*, 1997) y septicemia (Albridge *et al.*, 1993), las cuales pueden representar hasta el 28% de los casos (Albridge *et al.*, 1993). Si bien la información previa indica que estas bacterias se asocian a casos de septicemia en terneros (Korzh *et al.*, 1990; Fecteau *et al.*, 1997; Izzo *et al.*, 2015), resultó difícil poder establecer su importancia relativa. Por un lado, esto se debió a que los órganos positivos al cultivo bacteriológico de un mismo ternero presentaron lesiones histológicas de distinta severidad. Por otra parte, la importancia de cada muestra positiva al cultivo en un mismo ternero fue diferente (ej. cerebro y bilis). El muestreo sistemático de tres o más órganos (o fluidos) por animal, seguido del cultivo bacteriológico e histopatología, pueden ayudar a definir la implicancia de cada bacteria en los casos de septicemia polimicrobiana.

Los terneros incluidos en el presente estudio tenían 3 días de vida (1 ternero), 12-21 días (6), 30 días (1) y 35 días (1) al momento de manifestar los signos clínicos de septicemia o meningitis. Si bien la septicemia por *E. coli* se presenta con mayor frecuencia en terneros menores a 2 semanas de vida (Gay y Besser, 1994; Fecteau *et al.*, 2001; Fecteau *et al.*, 2009;

Gyles y Fairbrother, 2010), se ha observado que esta enfermedad puede afectar a terneros de hasta 28 días de vida (Fecteau *et al.*, 2009). Esta última descripción coincide con algunos de los casos clínicos evaluados. La colisepticemia en terneros mayores a 2 semanas de edad es una forma menos severa de la enfermedad y se caracteriza por el desarrollo de infecciones localizadas (artritis, meningitis, hipopión y neumonía) (Besser y Gay, 1995; Fecteau *et al.*, 2009). Esta presentación clínica (subaguda o crónica) es una consecuencia del retraso en la progresión de la bacteriemia (Besser y Gay, 1995) y puede atribuirse a fallas parciales en la TP de Acs calostrales o a infecciones con cepas de *E. coli* de menor virulencia (Fecteau *et al.*, 2009). Esta última explicación no parece ser extrapolable a los casos observados, ya que la mayoría de los aislamientos de *E. coli* presentaron diferentes combinaciones de GV (fimbrias, adhesinas afimbriales y aerobactina) y se obtuvieron de órganos con lesiones, las cuales representan un hallazgo relevante para establecer una asociación con la enfermedad (Morrell *et al.*, 2008; Uzal *et al.*, 2016).

Las cepas SePEC invaden el huésped, sobreviven a los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos y producen un daño en el hospedador por algún mecanismo (Fecteau *et al.*, 2001). En nuestro país existe poca información con respecto a los factores de virulencia que presentan las cepas SePEC bovinas. Un estudio caracterizó los aislamientos de *E. coli* obtenidos de terneros con septicemia mediante el empleo, principalmente, de técnicas fenotípicas (Mercado *et al.*, 2003), mientras que en otro trabajo se utilizaron técnicas moleculares, pero no se diferenció el origen de los aislamientos (diarrea o septicemia) (Vilte *et al.*, 2012). Por otra parte, si bien se considera que *E. coli* es una causa importante de meningitis en terneros (Green y Smith, 1992; Fecteau *et al.*, 2009; Cantile y Youssef, 2015), los estudios moleculares realizados con cepas de *E. coli* asociadas a bacteriemia o septicemia no especifican la presencia de dicha patología (Pohl *et al.*, 1992; Mainil *et al.*, 1997; Fecteau *et al.*, 2001; Ghanbarpour y Oswald, 2009; Ghanbarpour y Nazem, 2010; Marchese *et al.*, 2012). Por lo tanto, la caracterización molecular realizada en esta tesis aporta información muy valiosa inherente a los atributos de virulencia de las cepas tipo-ExPEC aisladas de terneros con septicemia y meningitis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mayoría (90%) de los aislamientos asociados a septicemia y meningitis presentaron GV que son considerados relevantes para las cepas SePEC bovinas. Por lo tanto, es evidente que los factores de virulencia confieren ciertas ventajas adaptativas frente a aquellas cepas que carecen de los mismos. Otras investigaciones arribaron a resultados similares y demostraron que el 61% (Ghanbarpour y Oswald, 2009), 76% (Fecteau *et al.*, 2001) y 90% (Ghanbarpour y Nazem, 2010) de las cepas de *E. coli* aisladas de terneros

enfermos (bacteriemia y septicemia) tienen genes o factores de virulencia. La caracterización realizada en esta tesis determinó un predominio de los marcadores genéticos para la aerobactina (*iucD*) (84%), las fimbrias Pap (*papC*) (39,2%), CS31A (*clpG*) (26%) y F17 (*f17G*) (22%) o la adhesina afimbrial Afa-VIII (*afa-8*) (28%). Los GV encontrados coinciden con aquellos descritos en cepas de *E. coli* asociadas a bacteriemia y septicemia en terneros de Irán (Ghanbarpour y Oswald, 2009; Ghanbarpour y Nazem, 2010), Italia (Marchese *et al.*, 2012), EEUU (Fecteau *et al.*, 2001), Francia y Bélgica (Pohl *et al.*, 1992; Bertín *et al.*, 2000; Van Bost *et al.*, 2001b).

El hierro es uno de los principales factores que limitan el crecimiento bacteriano en el hospedador, ya que se encuentra secuestrado en diferentes proteínas (Blanco *et al.*, 2002). No obstante, algunas cepas de *E. coli* logran adaptarse a un ambiente extracelular restringido en hierro mediante un sistema de transporte asociado a la aerobactina (sideróforo) que les permite multiplicarse en la sangre y en otros sitios extraintestinales (Blanco *et al.*, 2002; Gyles y Fairbrother, 2010). En el presente estudio, la aerobactina fue el atributo de virulencia identificado con mayor frecuencia y este hallazgo destaca su importancia en los aislamientos tipo-ExPEC asociados a septicemia y meningitis en terneros de tambo. Otros trabajos también indican que el 54-80% de las cepas SePEC de terneros con bacteriemia y septicemia tienen marcadores genéticos para el sistema de la aerobactina (*iucD* o *iutA*) (Fecteau *et al.*, 2001; Ghanbarpour y Nazem, 2010; Girardeu *et al.*, 2003; Marchese *et al.*, 2012). En condiciones experimentales este sideróforo tiene un rol muy importante en la diseminación sistémica de *E. coli*. La infección de corderos gnotobióticos por vía oral con la cepa bovina LN31A (CS31A+, Aer⁺ e Iut⁺) demostró que la misma fue capaz de colonizar el intestino y acceder a los linfonódulos mesentéricos, diseminándose hacia los diferentes órganos (hígado, bazo y riñón) y fluidos corporales. En cambio, la cepa mutada 322AN (CS31A+, Aer⁺ e Iut⁻) sólo alcanzó los linfonódulos mesentéricos y en número significativamente menor (Der Vartanian *et al.*, 1992).

Durante este trabajo de tesis se identificaron cepas SePEC que presentaron *iucD* como único marcador de virulencia (*iucD*+) (19%). Más específicamente, en una muestra de cerebro de un ternero con meningitis fibrino-supurativa se detectaron colonias con el genotipo *iucD*+. Si bien otros estudios describen cepas SePEC con este genotipo (6,5% y 31% de las cepas) (Ghanbarpour y Oswald, 2009; Ghanbarpour y Nazem, 2010), es posible que nuestros aislamientos también tengan otros atributos de virulencia no evaluados. Recientemente, un estudio en Noruega describió diferentes genes codificantes para adhesinas (*fimh*, *lpfA* y *bmaE*), además de *f17* y *afaE-8*, en una cepa de *E. coli* asociada a un brote de septicemia en corderos

(Kjelstrup *et al.*, 2013). Además, en los aislamientos SePEC del presente estudio tampoco se evaluaron otros GV (K1, *kpsMT II*, *traT*, *iss* y *ompT*) que suelen detectarse en cepas septicémicas de humanos (Smith *et al.*, 2007) y animales (Fecteau *et al.*, 2001; Mercado *et al.*, 2003; Kjelstrup *et al.*, 2013). Estos genes están asociados a la presencia de cápsula y a la resistencia frente a la actividad bactericida del suero, dos características importantes para la persistencia de SePEC en el hospedador.

Las fimbrias y adhesinas permiten que la bacteria pueda colonizar y competir a nivel de las mucosas, facilitando posteriormente la invasión y entrada en el torrente sanguíneo del hospedador (Gyles y Fairbrother, 2010). La mayoría (81%) de los aislamientos evaluados presentaron marcadores genéticos de fimbrias (*f17G*, *clpG* y *papC*) y de la adhesina afimbrial Afa-VIII (*afa-8*). En este sentido, las cepas ExPEC suelen tener una gran variedad de factores de adhesión (Mokady *et al.*, 2005b) y en coincidencia con nuestros hallazgos, los aislamientos SePEC de bovinos suelen presentar genes codificantes para F17, CS31A, Afa-VIII y Pap (Lalioui *et al.*, 1999; Bertin *et al.*, 2000; Gerardin *et al.*, 2000; Fecteau *et al.*, 2001; Van Bost *et al.*, 2001; Girardeu *et al.*, 2003; Ghanbarpour y Oswald, 2009; Ghanbarpour y Nazem, 2010; Marchese *et al.*, 2012). Los GV mencionados se detectan con mayor frecuencia en cepas no-NTEC y NTEC aisladas de casos de septicemia en comparación con aquellas cepas recuperadas de MF. Esta observación destaca su rol en las infecciones extraintestinales (Van Bost *et al.*, 2001b).

La genotipificación realizada permitió identificar a *papC* (39,2%) y *afa-8* (28%) como los marcadores de virulencia más frecuentes entre las fimbrias y adhesinas. No obstante, se debe tener en cuenta que la mayoría de los terneros provenían de un mismo establecimiento. Coincidiendo con estos resultados, investigadores italianos detectaron los operones de *pap* (40,4%) y *afa-8* (30%) en aislamientos de *E. coli* asociados a septicemia en terneros (Marchese *et al.*, 2012). En otro estudio también se observó una amplia distribución del operón *pap* (42%) entre las cepas aisladas de terneros enfermos (septicemia y/o diarrea). No obstante, en esta última investigación se encontró que una proporción importante de las cepas (72%) producían las fimbrias Pap, F17 y CS31A en forma simultánea, mientras que sólo el 38% de las cepas productoras de CS31A tuvieron la fimbria Pap asociada (Bertin *et al.*, 2000). A diferencia de esta observación, nuestros aislamientos no mostraron ningún patrón definido en cuanto a la distribución de los genes *papC*, *afa-8*, *clpG* y *f17G*.

La mayor frecuencia de *papC* y *afa-8* en los aislamientos SePEC resultó interesante, ya que tanto Pap como Afa-VIII son importantes en la patogenicidad. El gen *papC* está muy

conservado y por ello se lo utiliza como un marcador genético de la fimbria Pap (Bertin *et al.*, 2000). La proteína PapC es fundamental en la biogénesis de la fimbria aunque no forma parte de su estructura (Fernández y Berenguer, 2000). La fimbria Pap está formada por una fibrilla delgada que se ubica en el extremo de un pili más rígido y con forma de bastón (Nagy *et al.*, 2005). En el extremo de esta fibrilla se localiza la adhesina PapG y las cepas bovinas pueden presentar al menos dos variantes (PapGII y PapGIII) (Bertin *et al.*, 2000; Girardeu *et al.*, 2003). Un estudio demostró que la fimbria Pap protege a *E. coli* frente a la actividad bactericida de los neutrófilos. Esto puede atribuirse, en parte, a que la fimbria Pap inhibe la interacción de la bacteria con los neutrófilos. Además, la adhesina PapG reduce el estallido respiratorio de los mismos debido a sus propiedades electrostáticas (carga negativa) (Tewari *et al.*, 1994).

La adhesina Afa está codificada por un cluster de seis genes (*afaABCDEF*) y puede ser expresada por cepas de *E. coli* asociadas a ITU y diarrea en humanos y animales (Le Bouguéneq y Bertin, 1999). Un estudio realizado con cepas bovinas (Europa y Canadá) demostró que la frecuencia de *afa-8* era mayor en las cepas NTEC-1 (20%), NTEC-2 (26%) y no-NTEC (11%) aisladas de casos clínicos (septicemia y diarrea) con respecto a las cepas NTEC-2 (2%) y no-NTEC (0%) aisladas de terneros sin enfermedad (Gérardin *et al.*, 2000). En nuestro trabajo de investigación, la detección *afa-8* fue frecuente (28%) entre las cepas no-NTEC aisladas de terneros con septicemia y meningitis. El gen *afaE* codifica la subunidad estructural de la adhesina (AfaE) que participa en la unión específica hacia diferentes células (uroepiteliales, Hep-2 y HeLa), manteniendo un patrón que se denomina adherencia difusa (Le Bouguéneq y Bertin, 1999; Lalioui *et al.*, 1999). Las cepas productoras de la adhesina AfaE-VIII tienen la característica de poder adherirse a las líneas celulares MDCK y UROtsa, pero no a las células HeLa, Caco-2 y MDBK. Además, en cultivos de células HeLa se demostró que la proteína AfaD-VIII (del cluster *afa-8*) de una cepa bovina le confirió capacidad invasiva a una cepa humana de *E. coli* que presentaba una mutación en el gen *afaD-3* (del cluster *afa-3*) (Lalioui *et al.*, 1999).

En cuanto a las toxinas, ninguno de los aislamientos tipo-ExPEC asociados a septicemia y meningitis presentó genes codificantes para las mismas. Este hallazgo coincide con las investigaciones realizadas en distintos países, en las cuales se observó que los aislamientos SePEC de terneros no elaboraron toxinas (STA y VT) (Mercado *et al.*, 2003) ni presentaron los genes codificantes (*eltA*, *sta*, *stb*, *cnf1/2* y *vtx1/2*) (Fecteau *et al.*, 2001; Marchese *et al.*, 2012). Estas evidencias sugieren que la producción de algunas toxinas no es relevante para la virulencia de ExPEC (Ramos *et al.*, 2010). Por otra parte, la imposibilidad de aislar cepas NTEC (productoras de CNF) resultó particular, ya que en Francia y Bélgica se describen con frecuencia

cepas NTEC bovinas asociadas a infecciones extraintestinales (Oswald *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1992; Mainil *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001b). Posiblemente, estudios a futuro nos permitirán determinar la importancia relativa de NTEC como causa de colibacilosis septicémica, ya que en este trabajo de tesis se aislaron cepas NTEC-2 a partir de MF en terneros de tambo y cría.

Un aporte interesante de la caracterización molecular realizada fue demostrar la existencia de una gran diversidad de perfiles genéticos de virulencia entre las cepas tipo-ExPEC asociadas a septicemia y meningitis. Otros estudios también describen que los aislamientos SePEC de bovinos tienen diferentes combinaciones de GV (Fecteau *et al.*, 2001; Van Bost *et al.*, 2001b; Ghanbarpour y Nazem, 2010). Sin embargo, este trabajo demostró que la diversidad en las combinaciones de GV no sólo ocurre entre los aislamientos de distintas muestras de un mismo ternero, sino también entre los diferentes aislamientos de una misma muestra. No obstante, dicha heterogeneidad no permitió establecer si las colonias de una misma muestra y con distintos perfiles de GV correspondieron a un mismo clon, que adquirió los genes por transferencia horizontal (Mokady *et al.*, 2005b), o si en realidad representaron diferentes clones con distintos perfiles. Estudios a futuro utilizando PFGE (Marchese *et al.*, 2012) y MLST (Ding *et al.*, 2012) nos permitirán establecer la relación clonal entre los aislamientos para poder dilucidar estos interrogantes. No obstante ello, la elevada plasticidad genómica asociada a la virulencia de ExPEC está descrita en cepas humanas (Russo y Johnson, 2000; Mokady *et al.*, 2005b; Ron, 2006; Köhler y Dubrint, 2011), aviares (Mokady *et al.*, 2005a) y porcinas (Ding *et al.*, 2012), aún cuando muchas de estas cepas producen la misma enfermedad o tienen el mismo tejido *target* (Mokady *et al.*, 2005a). En las cepas humanas se ha observado que sólo algunos genes (o factores) de virulencia son comunes a todas ellas (Ron, 2006; Mokady *et al.*, 2005b) y es probable que sean esenciales (Ron, 2006). A partir de los resultados obtenidos, la aerobactina sería uno de estos atributos de virulencia comunes y esenciales para las cepas tipo-ExPEC de bovinos. Algunos investigadores también sostienen que las cepas de *E. coli* utilizan diferentes factores de virulencia (alternativos), los cuales cumplen roles similares en las distintas etapas del proceso infeccioso (Ron, 2006; Mokady *et al.*, 2005b). Es posible que esto mismo ocurra con las cepas tipo-ExPEC bovinas, ya que presentan una gran variedad de combinaciones posibles para los genes asociados a fimbrias y adhesinas (*clpG*, *f17G*, *papC* y *afa-8*).

El examen histológico de los órganos de terneros con septicemia y meningitis (T1-T6) permitió observar la presencia de lesiones. Este hallazgo fortalece la importancia clínica de los aislamientos bacterianos y establece una posible relación con los casos clínicos. En dos terneros con meningitis supurativa y fibrinosa se observaron bacilos cortos y gramnegativos (T1 y T2)

dentro de las lesiones y estas últimas coincidieron con las descripciones de la bibliografía (Cantile y Youssef, 2015). Por lo tanto, la obtención de un cultivo puro de *E. coli* a partir de las muestras de cerebro y la observación de bacilos cortos y gramnegativos dentro de las lesiones permiten confirmar la participación de *E. coli* en los casos de meningitis. Más interesante aún, estas cepas no sólo presentaron perfiles de GV muy diversos, sino que también mostraron multiresistencia frente a diferentes antimicrobianos. Según la bibliografía consultada, no existen trabajos que describan casos de meningitis bovina asociados a cepas de *E. coli* con las características mencionadas.

Los terneros con septicemia por *E. coli* suelen presentar un engrosamiento de los septos interalveolares debido a la presencia de infiltrados celulares (mononucleares y neutrófilos) (Brown *et al.*, 2007), congestión y edema (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003). En la luz de los alvéolos se puede observar un exudado ligeramente fibrinoso con algunos neutrófilos (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003). En este trabajo se observaron lesiones similares, principalmente el infiltrado inflamatorio de los septos interalveolares, y a partir de los especímenes de pulmón se obtuvieron aislamientos de *E. coli* que presentaron diferentes GV. Por otra parte, las lesiones observadas en el hígado y bazo también coincidieron con las descritas en la bibliografía. El hígado de los terneros enfermos (colisepticemia) suele presentar infiltrados celulares (linfocitos y neutrófilos) y hemorragias, aunque pueden no estar presentes en todos los animales (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003); en algunos casos los neutrófilos alcanzan un gran número dentro de los sinusoides hepáticos (Brown *et al.*, 2007). En las muestras de hígado de los terneros evaluados se observó la presencia de células mononucleares y neutrófilos, en forma de infiltrados periportales o distribuidos en el parénquima y en los sinusoides hepáticos; en algunos terneros también se observaron cambios vasculares (congestión y hemorragia) y vacuolización de hepatocitos. A partir de los especímenes de hígado y muestras de bilis de estos animales se obtuvieron aislamientos de *E. coli* con diferentes perfiles de GV. El bazo de los terneros con septicemia por *E. coli* puede presentar una corona de neutrófilos alrededor de la pulpa blanca (Brown *et al.*, 2007) o entrelazados con los linfocitos (Van Bost *et al.*, 2001a; Van Bost *et al.*, 2003). Esta misma lesión se observó en el bazo de uno de los terneros afectados, a partir del cual se obtuvieron aislamientos de *E. coli* con marcadores genéticos de virulencia.

Según la información disponible, al menos 3 terneros con septicemia y meningitis habían recibido tratamientos con antibióticos. No obstante ello, el uso de antimicrobianos no pareció afectar la posibilidad de aislar bacterias. Esta misma observación se describió en casos de

septicemia (Aldridge *et al.*, 1993) o de septicemia y meningitis (Green y Smith, 1992). En dichos estudios, 19 de 25 (Aldridge *et al.*, 1993) y 24 de 32 terneros habían recibido tratamientos con antibióticos (Green y Smith, 1992) y en más del 80% de los animales se pudieron aislar bacterias (Green y Smith, 1992; Aldridge *et al.*, 1993).

La resistencia antimicrobiana es un problema importante en medicina veterinaria y es una consecuencia del uso intensivo e incorrecto de las drogas antimicrobianas (Catry *et al.*, 2003). La multirresistencia bacteriana se define como aquella resistencia simultánea hacia al menos tres (Magiorakos *et al.*, 2012) o cuatro (Bywater *et al.*, 2004) antimicrobianos. Un hallazgo muy interesante de esta investigación fue identificar aislamientos de *E. coli* con multirresistencia frente a 11-14 antimicrobianos, los cuales representaron a ocho familias diferentes. Dichos aislamientos se obtuvieron de órganos de distintos terneros con septicemia y meningitis, los cuales a su vez mostraron perfiles genéticos de virulencia muy heterogéneos. Tres aislamientos tuvieron combinaciones de 4 (*f17G+afa-8+iucD+papC*) y 3 (*clpG+afa-8+iucD*) marcadores de virulencia. Un hallazgo similar se observó con un grupo clonal de cepas de *E. coli* aisladas de terneros con septicemia. El 38,3% (18/47) de estas cepas mostraron resistencia simultánea frente a la ampicilina, co-trimoxazol, tetraciclina, gentamicina, tiamfenicol y enrofloxacin. Además, muchas de estas cepas presentaron GV, entre ellos *pap* (40%), *iucD* (66%) y *afaE8/afaD8* (30%) (Marchese *et al.*, 2012). En este sentido, las cepas de *E. coli* aisladas de personas con ITU también pueden desarrollar multirresistencia antimicrobiana y portar GV característicos del patotipo ExPEC (Manges *et al.*, 2001). Investigaciones más recientes también aportan evidencias claras de la relación que existe entre la presencia de GV típicos de ExPEC y la multirresistencia antimicrobiana, ya sea en cepas de *E. coli* aisladas de MF de ratas (Guenther *et al.*, 2012) o en cepas productoras de β -lactamasa de espectro extendido (ESBL) obtenidas de animales de compañía (perro y gato) y equinos (Ewers *et al.*, 2014). A futuro es necesario estudiar las cepas tipo-ExPEC bovinas con la finalidad evaluar la resistencia antibiótica y los genes implicados en la misma (ej. *tet(A-D)*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *strA/B*, *aadA*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, entre otros) (Guenther *et al.*, 2012; Ewers *et al.*, 2014). Este abordaje permitirá conocer la magnitud del problema (multirresistencia) y las bases moleculares que confieren esta característica.

Consideraciones finales y conclusiones

- ✓ La circulación de RVA tuvo una amplia distribución en los tambos y campos de cría de la región estudiada, mientras que CoVB circuló con menor frecuencia y estuvo restringido a los tambos.
- ✓ RVA estuvo mayormente asociado a casos de diarrea en los terneros evaluados, representando una causa importante de diarrea neonatal en la región.
- ✓ Las infecciones por RVA fueron frecuentes en terneros de cría para carne, mientras que las infecciones por CoVB ocurrieron esporádicamente y sólo afectaron a terneros de tambo.
- ✓ El sistema productivo y la condición clínica del ternero son variables asociadas al riesgo de infección por RVA.
- ✓ La frecuencia y diversidad de los genotipos G y P de RVA mostraron diferencias epidemiológicas muy evidentes de acuerdo al sistema productivo (carne y tambo).
- ✓ El análisis filogenético de VP7 de RVA demostró que la primera cepa bovina G8P[11] de Argentina tuvo una íntima relación filogenética con diferentes cepas G8 obtenidas de cabras y camélidos sudamericanos de nuestro país. Este hallazgo sugiere que el gen codificante para VP7 tuvo un origen común entre las diferentes cepas.
- ✓ Los genes codificantes para VP7 y VP8* de las cepas G6(IV)P[5] mostraron una estrecha relación filogenética de acuerdo a la ubicación geográfica de los campos de cría. Por esta razón, podría esperarse una menor variabilidad genética entre cepas procedentes de campos de cría ubicados en determinadas zonas.
- ✓ Las cepas circulantes G6(IV)P[5] y G10P[11] mantuvieron conservadas las regiones antigénicas de VP7 y VP8* con respecto a las cepas vacunales. Por lo tanto, es probable que las cepas incluidas en las vacunas confieran protección cruzada. Sin embargo, las cepas G6(III)P[11] mostraron mayor variabilidad en los sitios antigénicos de VP7.
- ✓ Las cepas de RVA con genotipos G6(III)P[11] y G10P[11], característicos de tambo, fueron capaces de infectar y producir diarrea en terneros descalostrados. Este hallazgo demuestra el rol patogénico de dichas cepas.

- ✓ Se evaluaron y caracterizaron por primera vez en Argentina los genes de virulencia de distintos patotipos de *E. coli* (ETEC, EPEC, VTEC-EHEC, tipo-ExPEC y NTEC) en terneros diarreicos, sin diarrea, con septicemia y meningitis. .
- ✓ Los datos obtenidos indican que el patotipo ETEC no sería una causa frecuente de diarrea en los terneros de nuestra región, aunque no se descarta su circulación.
- ✓ Independientemente de la condición clínica de los terneros, los aislamientos de *E. coli* con genes de virulencia característicos del patotipo SePEC (tipo-ExPEC) predominaron en las heces de terneros de cría para carne y tambo.
- ✓ No se pudo establecer una relación entre la presencia de diarrea y la detección de genes de virulencia o genotipos correspondientes a SePEC (tipo-ExPEC), NTEC y EPEC. Sin embargo, es posible que algunos genotipos puedan estar asociados a diarrea. Una gran proporción de los aislamientos de *E. coli* de terneros de cría con diarrea presentaron 2 o más genes de virulencia.
- ✓ Algunos aislamientos fecales de *E. coli* mostraron perfiles genéticos de virulencia idénticos a los observados en las cepas de órganos y fluidos corporales de terneros con septicemia. Por lo tanto, una proporción importante de los terneros excreta cepas de *E. coli* potencialmente patógenas en la materia fecal, incluso en animales coinfectados con rotavirus y coronavirus.
- ✓ El marcador genético de virulencia *fl7G* estuvo ampliamente distribuido en los aislamientos fecales de *E. coli*, sugiriendo que las futuras vacunas deberían incluir cepas que expresen la fimbria F17.
- ✓ Los aislamientos tipo-ExPEC asociados a septicemia y meningitis en terneros de tambo mostraron perfiles genéticos de virulencia muy heterogéneos, resultando la aerobactina un atributo de virulencia muy importante. Asimismo, los aislamientos tipo-ExPEC presentaron multiresistencia antimicrobiana, independientemente de los genotipos de virulencia.

Bibliografía

- Acres, S.D.; Isaacson, R.E.; Babiuk, L.A.; Kapitan, R.A. (1979). Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.* 25, 121-126.
- Agbodaze, D. (1999). Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli*: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 221-230.
- Aidar, L.; Penteado, A.S.; Trabulsi, L.R.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Pestana de Castro, A.F. (2000). Subtypes of intimin among non-toxigenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in Brazil. *Can. J. Vet. Res.* 64, 15-20.
- Aidar-Ugrinovich, L.; Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Leomil, L.; Dahbi, G.; Mora, A.; Onuma, D.L.; Silveira, W.D.; Pestana de Castro, A.F. (2007). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 297-306.
- Aijaz, S.; Gowda, K.; Jagannath, H.V.; Reddy, R.R.; Maiya, P.P.; Ward, R.L.; Greenberg, H.B.; Raju, M.; Babu, A.; Rao, C.D. (1996). Epidemiology of symptomatic human rotaviruses in Bangalore and Mysore, India, from 1988 to 1994 as determined by electropherotype, subgroup and serotype analysis. *Arch. Virol.* 141, 715-726.
- Akam, A.; Khelef, D.; Kaidi, R.; Rahal, K.H.; Tali-Maamar, H.; Yabrir, B.; Laoun A.; Mostfaoui, A.; Boutaiba, S.; Cozma, V. (2011). The frequency of the shedding of *Cryptosporidium parvum*, F5 *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus and *Salmonella* spp. in young dairy calves in Mitidja area (Algeria). *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 2, 16-25.
- Aldridge, B.M.; Garry, F.B.; Adams, R. (1993). Neonatal septicemia in calves: 25 cases (1985-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 1324-1329.
- Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A.; Barreiros, M.A.B.; Leite, J.P.G.; Richtzenhain, L.J. (2004). G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. *Vet. Microbiol.* 99, 167-173.
- Alfieri, A.A.; Parazzi, M.E.; Takiuchi, E.; Médici, K.C.; Alfieri, A.F. (2006). Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 521-526.
- Alkan, F.; Ozkul, A.; Oguzoglu, T.C.; Timurkan, M.O.; Caliskan, E.; Martella, V.; Burgu, I. (2010). Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997–2008. *Vet. Microbiol.* 141, 231-237.
- Alkan, F.; Gulyaz, V.; Timurkan, O.M.; Iyisan, S.; Ozdemir, S.; Turan, N.; Buonavoglia, C.; Martella, V. (2012). A large outbreak of enteritis in goat flocks in Marmara, Turkey, by G8P[1] group A rotaviruses. *Arch. Virol.* 157, 1183-1187.
- Al-Yousif, Y.; Anderson, J.; Chard-Bergstrom, C.; Bustamante, A.; Muenzenberger, M.; Austin, K.; Kapil, S. (2001). Evaluation of a latex agglutination kit (Virogen Rotatest) for detection of bovine rotavirus in fecal samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 496-498.

- Arias, C.F.; Romero, P.; Álvarez, V.; López, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70, 5832-5839.
- Asano, K.M.; Gregori, F.; Souza, S.P.; Rotava, D.; Oliveira, R.N.; Villarreal, L.Y.B.; Richtzenhain, L.J.; Brandão, P.E. (2011). Bovine rotavirus in turkeys with enteritis. *Avian Dis.* 55, 697-700.
- Athanassious, R.; Marsolais, G.; Assaf, R.; Dea, S.; DescOteaux, J.P.; Dulude, S.; Montpetit, C. (1994). Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. *Can. Vet. J.* 35, 163-169.
- Badaracco, A.; Garaicoechea, L.; Rodríguez, D.; Louge Uriarte, E.L.; Odeón, A.; Bilbao, G.; Galarza, R.; Abdala, A.; Fernández, F.; Parreño, V. (2012). Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Vet. Microbiol.* 158, 394-399.
- Badaracco, A.; Matthijnsens, J.; Romero, S.; Heylen, E.; Zeller, M.; Garaicoechea, L.; Van Ranst, M.; Parreño, V. (2013a). Discovery and molecular characterization of a group A rotavirus strain detected in an Argentinean vicuña (*Vicugna vicugna*). *Vet. Microbiol.* 161, 247-254.
- Badaracco, A.; Garaicoechea, L.; Matthijnsens, J.; Louge Uriarte, E.L.; Odeón, A.; Bilbao, G.; Fernández, F.; Parra, G.; Parreño, V. (2013b). Phylogenetic analyses of typical bovine rotavirus genotypes G6, G10, P[5] and P[11] circulating in Argentinean beef and dairy herds. *Infect. Genet. Evol.* 18, 18-30.
- Badouei, M.A.; Salehi, T.Z.; Khorasgani, M.R.; Tadjbakhsh, H.; Brujeni, G.N. (2010). Occurrence and characterisation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic calves. *Comp. Clin. Path.* 19, 295-300.
- Bányai, K.; Gentsch, J.R.; Griffin, D.D.; Holmes, J.L.; Glass, R.I.; Szucs, G. (2003). Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary. *J. Med. Virol.* 71, 124-134.
- Bányai, K.; Bogdán, Á.; Domonkos, G.; Kisfali, P.; Molnár, P.; Tóth, A.; Meleg, B.; Martella, V.; Gentsch, J.R.; Szűcs, G. (2009). Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. *J. Med. Virol.* 81, 362-370.
- Bányai, K.; Papp, H.; Dandar, E.; Molnar, P.; Mihaly, I.; Van Ranst, M.; Martella, V.; Matthijnsens, J. (2010). Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain. *Infect. Genet. Evol.* 10, 1140-1144.
- Barrandeguy, M.E.; Cornaglia, E.M.; Gottschalk, M.; Fitjman, N.; Pasini, M.I.; Gómez Yafal, A.; Parraud, J.; Schudel, A.A. (1988). Rotavirus, enterotoxigenic *Escherichia coli* and other agents in the feces of dairy calves with and without diarrhoea. *Rev. Lat. Am. Microbiol.* 30, 239-245.
- Barrow, G.I.; Feltham, R.K.A. (eds.) (1993). Bacterial characters and characterization, pp 21-45. The Enterobacteria, pp 128-150. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria (3rd. ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Barry, A.F.; Alfieri, A.F.; Stipp, D.T.; Alfieri, A.A. (2009). Bovine coronavirus detection in a collection of diarrheic stool samples positive for group a bovine rotavirus. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 52, 45-49.

- Bellamy, J.E.; Acres, S.D. (1979). Enterotoxigenic colibacillosis in colostrum-fed calves: pathologic changes. *Am. J. Vet. Res.* 40, 1391-1397.
- Bellinzoni, R.C.; Mattion, N.; La Torre, J.L.; Scodeller, E.A. (1987). Incidence of rotavirus in beef herds in Argentina. *Res. Vet. Sci.* 42, 257-259.
- Bellinzoni, R.C.; Blackhall, J.; Baro, N.; Auza, N.; Mattion, N.; Casaro, A.; La Torre, J.L.; Scodeller, E.A. (1989). Efficacy of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus vaccine in the control of calf diarrhoea in beef herds in Argentina. *Vaccine* 7, 263-268.
- Bellinzoni, R.C.; Blackhall, J.; Terzolo, H.R.; Moreira, A.R.; Auza, N.; Mattion, N.; Micheo, G. L.; La Torre, J.L.; Scodeller, E.A. (1990). Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.* 22, 130-136.
- Bendali, F.; Bichet, H.; Schelcher, F.; Sanaa, M. (1999). Risk factors associated with diarrhoea in newborn calves. *Vet. Res.* 30, 509-522.
- Bertin, Y.; Girardeau, J.P.; Darfeuille-Michaud, A.; Contrepolis, M. (1996a). Characterization of 20K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infect. Immun.* 64, 332-342.
- Bertin, Y.; Martin, C.; Oswald, E.; Girardeau, J.P. (1996b). Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2921-2928.
- Bertin, Y.; Martin, C.; Girardeau, J.P.; Pohl, P.; Contrepolis, M. (1998). Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 235-239.
- Bertin, Y.; Girardeau, J.P.; Darfeuille-Michaud, A.; Martin, C. (2000). Epidemiological Study of *pap* Genes among Diarrheagenic or Septicemic *Escherichia coli* Strains Producing CS31A and F17 Adhesins and Characterization of Pap_{31A} Fimbriae. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1502-1509.
- Besser, T.E.; Gay, C.C. (1995). Colibacillosis septicémica y falla en la transferencia pasiva de inmunoglobulina calostrual en terneros, pp 1-20. *En: Hunt, E. (ed.). Diarrea del Ternero. Clin. Vet. N. Am. Intermédica, Buenos Aires, AR.*
- Beutin, L.; Montenegro, M.A.; Ørskov, I.; Ørskov, F.; Prada, J.; Zimmermann, S.; Stephan, R. (1989). Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2559-2564.
- Beutin, L.; Zimmermann, S.; Gleier, K. (1996). Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2812-2814.
- Bicalho, R.C.; Machado, V.S.; Bicalho, M.L.S.; Gilbert, R.O.; Teixeira, A.G.V.; Caixeta, L.S.; Pereira, R.V.V. (2010). Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 93, 5818-5830.

- Bihannic, M.; Ghanbarpour, R.; Auvray, F.; Cavalié, L.; Châtre, P.; Boury, M.; Brugère, H.; Madec, J-Y.; Oswald, E. (2014). Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Vet. Res.* 45, 76.
- Bindereif, A.; Neilands, J.B. (1985). Aerobactin genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 161, 727-735
- Blackhall, J.; Bellinzoni, R.; Mattion, N.; Estes, M.K.; La Torre, J.; Magnusson, G. (1992). A bovine rotavirus serotype 1: serologic characterization of the virus and nucleotide sequence determination of the structural glycoprotein VP7 gene. *Virology* 189, 833-837.
- Blanchard, P.C. (2012). Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea, pp 443-464. In: V.L. Cooper (ed.). Diagnostic Pathology. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 28. Elsevier Inc.
- Blanco, J.; González, E.A.; García, S.; Blanco, M.; Regueiro, B.; Bernardez, I. (1988). Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (north-western Spain). *Vet. Microbiol.* 18, 297-311.
- Blanco, J.; Blanco, M. (eds.) (1993). *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico, pp 7-330. Servicio Publicaciones Diputación Provincial Lugo, Galicia, España.
- Blanco, M.; Blanco, J.; Blanco, J.E.; Ramos, J. (1993). Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1446-1451.
- Blanco, M.; Blanco, J.E.; Blanco, J.; Alonso, M.P.; Balsalobre, C.; Mouriño, M.; Madrid, C.; Juárez, A. (1996). Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *J. Microbiol. Meth.* 26, 95-101.
- Blanco, M.; Blanco, J.E.; González, E.A.; Mora, A.; Jansen, W.; Gomes, T.A.T.; Zerbini, L.F.; Yano, T.; Pestana de Castro, A.F.; Blanco, J. (1997). Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O: K: H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2958-2963.
- Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Blanco, J. (1998). Distribution and characterization of faecal necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1⁺ and CNF2⁺ isolated from healthy cows and calves. *Vet. Microbiol.* 59, 183-192.
- Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A., Alonso, M.P.; González, E.A.; Bernárdez, M.I. (2002). Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*, pp 301-325. En: S. Vadillo Machota; S. Píriz Durán; E. Mateos Yanes (eds.). Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, ES.
- Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Rey, J.; Alonso, J.M.; Hermoso, M.; Hermoso, J.; Alonso, M.P.; Dahbi, G.; González, E.A.; Bernárdez, M.I.; Blanco, J. (2003). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1351-1356.

- Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Dahbi, G.; Alonso, M.P.; González, E.A.; Bernárdez, M.I.; Blanco, J. (2004). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *J. Clin. Microbiol.* 42, 645-651.
- Blanco, M.; Lazo Pérez, L.; Blanco, J.E.; Dhahi, G.; Mora, A.; López, C.; González, E.A.; Blanco, J. (2006). Serotypes, virulence genes and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhoea. *Int. Microbiol.* 9, 53-60.
- Boileau, M.J.; Kapil, S. (2010). Bovine coronavirus associated syndromes, pp 123-146. *In: S. Kapil; D. Scott McVey (eds.). Emerging, Reemerging, and Persistent Infectious Diseases of Cattle. Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 26. Elsevier Inc.
- Bok, M.; Miño, S.; Rodríguez, D.; Badaracco, A.; Nuñez, I.; de Souza, S.P.; Bilbao, G.; Louge Uriarte, E.; Galarza, R.; Vega, C.; Odeon, A.; Saif, L.J.; Parreño, V. (2015). Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Vet. Microbiol.* 181, 221-229.
- Brandt, C.D.; Kim, H.W.; Rodríguez, W.J.; Thomas, L.; Yolken, R.H.; Arrobio, J.O.; Kapikian, A.Z.; Parrott, R.H.; Chanock, R.M. (1981). Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* 13, 976-981.
- Bridger, J.C. (1994). A definition of bovine rotavirus virulence. *J. Gen. Virol.* 75, 2807-2812.
- Brown, C.C.; Baker, D.C.; Barker I.K. (2007). Alimentary system, pp 1-296. *In: M.G. Maxie (ed.) Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals (5th ed.). Saunders/Elsevier, Philadelphia, US.*
- Bok, K.; Castagnaro, N.; Borsa, A.; Nates, S.; Espul, C.; Fay, O.; Fabri, A.; Grinstein, S.; Miceli, I.; Matson, D.O.; Gómez, J.A. (2001). Surveillance for rotavirus in Argentina. *J. Med. Virol.* 65, 190-198.
- Borczyk, A.A.; Karmali, M.A.; Lior, H.; Duncan, L.M.C. (1987). Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* 0157: H7. *Lancet* 329, 98.
- Buesa, J.; Colomina, J.; Raga, J.; Villanueva, A.; Prat, J. (1996). Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. *Res. Virol.* 147, 353-361.
- Bulgin, S.; Anderson, B.C.; Ward, A.C.S.; Evermann J.F. (1982). Infectious agents associated with neonatal calf disease in southwestern Idaho and eastern Oregon. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 1222-1226.
- Burns, A.L.; Ball, H.J.; Finlay, D.A. (1996). CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 49, 235-241.
- Butler, D.G.; Clarke, R.C. (1994). Diarrhoea and dysentery in calves, pp 91-116. *In: C.L. Gyles (Ed.) Escherichia coli in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, UK.*

- Bywater, R.; Deluyker, H.; Deroover, E.; de Jong, A.; Marion, H.; McConville, M.; Rowan, T.; Shryock, T.; Shuster, D.; Thomas, V.; Vallé, M.; Walters, J. (2004). A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 744-754.
- Campero, C.M.; Odeón, A.C.; Binsztein, N.; Smith, J.; Cipolla, A.L. (1985). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* aisladas de terneros afectados de diarrea neonatal. *Rev. Argent. Microbiol.* 17, 203-208.
- Cantile, C.; Youssef, S. (2015). Nervous System, pp 251–406. In: M.G. Maxie (ed.). Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals (6th Ed.). Elsevier, St Louis, Missouri, US.
- Caprioli, A.; Falbo, V.; Roda, L.G.; Ruggeri, F.M.; Zona, C. (1983). Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* 39, 1300-1306.
- Caprioli, A.; Morabito, S.; Brugère, H.; Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289-311.
- Carbonero, A.; Maldonado, A.; Perea, A.; Astorga, R.; Luque, I.; Huerta, B.; Arenas, A. (2007). Caracterización productiva y sanitaria de la cría de terneros lactantes en Córdoba y Santa Fé (Argentina). *Arch. Zootec.* 56, 851-862.
- Carrillo, J. (ed.) (2001). La explotación de cría bovina, pp 1-19. En: Manejo de un rodeo de cría. Editorial Centro Regional Buenos Aires Sur, AR.
- Carvalho, F.R.; DebRoy, C.; Baeza, E.; Hinckley, L.; Gilbert, K.; Choi, S.J.; Risatti, G.; Smyth, J.A. (2010). Necrotizing pneumonia and pleuritis associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a tiger (*Panthera tigris*) cub. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 136-140.
- Cashman, O.; Lennon, G.; Sleator, R.D.; Power, E.; Fanning, S.; O'Shea, H. (2010). Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009. *Vet. Microbiol.* 146, 238-244.
- Castello, A.A.; Argüelles, M.H.; Rota, R.P.; Olthoff, A.; Jiang, B.; Glass, R.I.; Gentsch, J.R.; Glikmann, G. (2006). Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2046-2050.
- Catry, B.; Laevens, H.; Devriese, L.A.; Opsomer, G.; De Kruif, A. (2003) Antimicrobial resistance in livestock. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 26, 81-93.
- Chang, K.O.; Parwani, A.V.; Saif, L.J. (1996). The characterization of VP7 (G type) and VP4 (P type) genes of bovine group A rotaviruses from field samples using RT-PCR and RFLP analysis. *Arch. Virol.* 141, 1727-1739.
- Chanter, N.; Hall, G.A.; Bland, A.P.; Hayle, A.J.; Parsons, K.R. (1986). Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). *Vet. Microbiol.* 12, 241-253.
- Chen, H.D.; Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 83-98.

- China, B.; Pirson, V.; Mainil, J. (1998). Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. *Vet. Microbiol.* 63, 249-259.
- Chinsangaram, J.; Akita, G.Y.; Castro, A.E.; Osburn, B.I. (1993). PCR detection of group A bovine rotaviruses in feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 516-521.
- Cho, K.O.; Hasoksuz, M.; Nielsen, P.R.; Chang, K.O.; Lathrop, S.; Saif, L.J. (2001). Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch. Virol.* 146, 2401-2419.
- Cho, Y.I.; Han, J.I.; Wang, C.; Cooper, V.; Schwartz, K.; Engelken, T.; Yoon, K.J. (2013). Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Vet. Microbiol.* 166, 375-385.
- Cho, Y.I.; Yoon, K.J. (2014). An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 15, 1-17.
- Christy, C.; Vosefski, D.; Madore, H.P. (1990). Comparison of three enzyme immunoassays to tissue culture for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1428-1430.
- Ciarlet, M.; Hoffmann, C.; Lorusso, E.; Baselga, R.; Cafiero, M.A.; Bányai, K.; Matthijssens, J.; Parreño, V.; de Grazia, S.; Buonavoglia, C.; Martella, V. (2008). Genomic characterization of a novel group A lamb rotavirus isolated in Zaragoza, Spain. *Virus Genes* 37, 250-265.
- Cid, D.; Sanz, R.; Marín, I.; De Greve, H.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Amils, R.; de la Fuente, R. (1999). Characterization of Nonenterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Producing F17 Fimbriae Isolated from Diarrheic Lambs and Goat Kids. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1370-1375.
- Cilli, V.; Castrucci, G. (1981). Viral diarrhea of young animals: a review. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 4, 229-242.
- Clarke, S.C.; Haigh, R.D.; Freestone, P.P.E.; Williams, P.H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 365-378.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA, US.
- Constable, P.D. (2004). Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 8-17.
- Contrepois, M.; Dubourguier, H.C.; Parodi, A.L.; Girardeau, J.P.; Ollier, J.L. (1986). Septicaemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Vet. Microbiol.* 12, 109-118.
- Contrepois, M.; Fairbrother, J.M.; Kaura, Y.K.; Girardeau, J.P. (1989). Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. *FEMS Microbiol. Lett.* 59, 319-323.
- Contrepois, M.; Bertin, Y.; Pohl, P.; Picard, B.; Girardeau, J.P. (1998). A study of relationships among F17 a producing enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic calves. *Vet. Microbiol.* 64, 75-81.

- Cook, N.; Bridger, J.; Kendall, K.; Gomara, M.I.; El-Attar, L.; Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infection* 48, 289-302.
- Corley, L.D.; Staley, T.E.; Bush, L.J.; Jones, E.W. (1977). Influence of Colostrum on Transepithelial Movement of *Escherichia coli* 055. *J. Dairy Sci.* 60, 1416-1421.
- Cornaglia, E.M.; Barrandeguy, M.E.; Fitjman, N.; Schudel, A.A. (1989). Enzyme linked immunosorbent assay, immunofluorescent test and electrophoresis analysis of rotaviral RNA in the diagnosis and characterization of the bovine rotavirus. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 31, 59-62.
- Cornaglia, E.M.; Fernández, F.M.; Gottschalk, M.; Barrandeguy, M.E.; Luchelli, A.; Pasini, M.I.; Saif, L.J.; Parraud, J.R.; Romat, A.; Schudel, A.A. (1992). Reduction in morbidity due to diarrhea in nursing beef calves by use of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus-*Escherichia coli* vaccine in the dam. *Vet. Microbiol.* 30, 191-202.
- Costa, E.F.; Fazzio, L.E.; Traveria, G.E.; Sánchez, R.O.; Alvarado Pinedo, M.F.; Mattioli, G.A.; Otero, M.M.; Chialva, M.; Romero, J.M. (2004). Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. *Rev. Med. Vet.* 85, 16-22.
- Cowley, D.; Donato, C.M.; Roczo-Farkas, S.; Kirkwood, C.D. (2013). Novel G10P[14] rotavirus strain, northern territory, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1324-1327.
- Crouch, C.F.; Acres, S.D. (1984). Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows. *Can. J. Comp. Med.* 48, 340.
- Cunliffe, N.A.; Gondwe, J.S.; Broadhead, R.L.; Molyneux, M.E.; Woods, P.A.; Bresee, J.S.; Glass, R.I.; Gentsch, J.R.; Hart, C.A. (1999). Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *J. Med. Virol.* 57, 308-312.
- Dean-Nystrom, E.A.; Bosworth, B.T.; Cray, W.C.; Moon, H.W. (1997). Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect. Immun.* 65, 1842-1848.
- Dean-Nystrom, E.A.; Bosworth, B.T.; Moon, H.W.; O' Brien, A.D. (1998). *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect. Immun.* 66, 4560-4563.
- DebRoy, C.; Roberts, E.; Jayarao, B.M.; Brooks, J.W. (2008). Bronchopneumonia associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a horse. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 661-664.
- de la Fuente, R.; García, A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Luzón, M.; Cid, D.; García, S.; Orden, J.A.; Gómez-Bautista, M. (1998). Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev. Vet. Med.* 36, 145-152.
- De Lorenzo, V.; Bindereif, A.; Paw, B.H., Neilands, J.B. (1986). Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 165, 570-578.
- De Rycke, J.; González, E.A.; Blanco, J.; Oswald, E.; Blanco, M.; Boivin, R. (1990). Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 694-699.

- De Rycke, J.; Milon, A.; Oswald, E. (1999). Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet. Res.* 30, 221-233.
- Der Vartanian, M.; Jaffeux, B.; Contrepolis, M.; Chavarot, M.; Girardeau, J.P.; Bertin, Y.; Martin, C. (1992). Role of aerobactin in systemic spread of an opportunistic strain of *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic lambs. *Infect. Immun.* 60, 2800-2807.
- Desselberger, U. (2000). Rotaviruses: Basic Facts, pp 1-8 *In: J. Gray; U. Desselberger. Rotaviruses. Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, US.*
- Desselberger, U.; Iturriza-Gómara, M.; Gray, J.J. (2001). Rotavirus epidemiology and surveillance. *In: Novartis Foundation symposium* 238, 125.
- de Verdier Klingenberg, K.; Nilsson, M.; Svensson, L. (1999). Rotavirus G-type restriction, persistence, and herd type specificity in Swedish cattle herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 181-185.
- Dhama, K.; Chauhan, R.S.; Mahendran, M.; Malik, S.V. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* 33, 1–23.
- Ding, Y.; Tang, X.; Lu, P.; Wu, B.; Xu, Z.; Liu, W.; Zhang, R.; Bei, W.; Chen, H.; Tan, C. (2012). Clonal analysis and virulent traits of pathogenic extraintestinal *Escherichia coli* isolates from swine in China. *BMC Vet. Res.* 8, 140.
- Doan, Y.H.; Nakagomi, T.; Aboudy, Y.; Silberstein, I.; Behar-Novat, E.; Nakagomi, O.; Shulman, L.M. (2013). Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. *J. Clin. Microbiol.* 51, 182-189.
- Doll, K. (2005). Diarrhea neonatal, pp 510-521. *En: G. Dirksen; H-D. Gründer; M. Stöber (eds.). Medicina Interna y Cirugía del Bovino. Intermédica, Buenos Aires, AR.*
- Dormitzer, P.R.; Sun, Z.Y.J.; Wagner, G.; Harrison, S.C. (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.* 21, 885-897.
- El-Attar, L.; Dhaliwal, W.; Iturriza-Gómara, M.; Bridger, J.C. (2002). Identification and molecular characterization of a bovine G3 rotavirus which causes age-independent diarrhea in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 40, 937-942.
- El Mazouari, K.; Oswald, E.; Hernalsteens, J.P.; Lintermans, P.; De Greve, H. (1994). F17-like fimbriae from an invasive *Escherichia coli* strain producing cytotoxic necrotizing factor type 2 toxin. *Infect. Immun.* 62, 2633-2638.
- El Sherif, M.; Esona, M.D.; Wang, Y.; Gentsch, J.R.; Jiang, B.; Glass, R.I.; Abou Baker, S.; Klena, J.D. (2011). Detection of the first G6P[14] human rotavirus strain from a child with diarrhea in Egypt. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1436-1442.
- Esona, M.D.; Page, N.A.; Akran, V.A.; Armah, G.E.; Steele, A.D. (2010). Characterization of 2 human genotype G10 rotavirus strains, 3008CM and 1784/CI/1999, isolated in Cameroon and Cote d'Ivoire during the 1999–2000 rotavirus season. *J. Infect. Dis.* 202, S212–S219.

- Espinasse, J.; Navetat, H.; Contrepois, M.; Baroux, D.; Schelcher, F. (1991). A new diarrhoeic syndrome with ataxia in young Charolais calves: clinical and microbiological studies. *Vet. Rec.* 128, 422-425.
- Estes, M.K.; Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53, 410-449.
- Estes, M.K. (1996). Rotaviruses and their replication, pp 1752–1766. *In*: B.N. Fields; D.M. Knipe; P.M. Howley; R.M. Chanock; J.L. Melnick; T.P. Monath; B. Roizman; S.E. Straus (eds.). *Fields Virology* (3rd ed.). Raven Lippincott, Philadelphia, NY, US.
- Estes, M.K. (2001). Rotaviruses and their replication, pp. 1747-1777. *In*: B.N. Fields; P.M. Howley; D.E. Griffin; R.A. Lamb; M.A. Martin; B. Roizman; S.E. Straus; D.M. Knipe (eds.). *Fields Virology* (4th ed.). Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, NY, US.
- Estes, M.K.; Kapikian, A.Z. (2007). Rotaviruses, pp 1917–1974. *In*: D.M. Knipe; P.M. Howley; D.E. Griffin; R.A. Lamb; M.A. Martin; B. Roizman; S.E. Straus (eds.). *Fields Virology* (5th ed.). Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, NY, USA.
- Ewers, C.; Schüffner, C.; Weiss, R.; Baljer, G.; Wieler, L.H. (2004). Molecular characteristics of *Escherichia coli* serogroup O78 strains isolated from diarrheal cases in bovines urge further investigations on their zoonotic potential. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 504-514.
- Ewers, C.; Bethe, A.; Stamm, I.; Grobbel, M.; Kopp, P.A.; Guerra, B.; Stubbe, M.; Doi, Y.; Zong, Z.; Kola, A.; Schaufler, K.; Semmler, T.; Fruth, A.; Wieler, L.H.; Guenther, S. (2014). CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence?. *J. Antimicrob. Chemother.* 1-7
- Falcone, E.; Tarantino, M.; Di Trani, L.; Cordioli, P.; Lavazza, A.; Tollis, M. (1999). Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3879-3882.
- Fecteau, G.; Van Metre, D.C.; Pare, J.; Smith, B.P.; Higgins, R.; Holmberg, C.A.; Jang, S.; Guterbock, W. (1997). Bacteriological culture of blood from critically ill neonatal calves. *Can. Vet. J.* 38, 95-100.
- Fecteau, G.; Fairbrother, J.M.; Higgins, R.; Van Metre, D.C.; Paré, J.; Smith, B.P.; Holmberg, C.A.; Jang, S. (2001). Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves. *Vet. Microbiol.* 78, 241-249.
- Fecteau, G.; Smith, B.P.; George, L.W. (2009). Septicemia and meningitis in the newborn calf, pp 195-208. *In*: G.W. Smith (ed.). *Bovine Neonatology. Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 25. Elsevier Inc.
- Fernández, F. (1997). Complejo diarrea neonatal del ternero. Jornada Interactiva de Salud Animal- Boehringer Ingelheim, 75-81.
- Fernández, L.A.; Berenguer, J. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 21-44.

- Fernández, M.E.; Campero, C.M.; Morrell, E.; Cantón, G.J.; Moore, D.P.; Cano, A.; Malena, R.; Odeón, A.C.; Paolicchi, F.; Odriozola, E.R. (2007). Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. *Rev. Med. Vet.* 88, 246-254.
- Fernández, D.; Rodríguez, E.M.; Arroyo, G.H.; Padola, N.L.; Parma, A.E. (2009). Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (*stx*) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *J. Appl. Microbiol.*, 106, 1260-1267.
- Franck, S.M.; Bosworth, B.T.; Moon, H.W. (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1795-1797.
- Frankel, G.; Giron, J.A.; Valmassoi, J.; Schoolnik, G.K. (1989). Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. *Mol. Microbiol.* 3, 1729-1734.
- Fukai, K.; Sakai, T.; Hirose, M.; Itou, T. (1999). Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. *Vet. Microbiol.* 66, 301-311.
- Fukai, K.; Saito, T.; Inoue, K.; Sato, M. (2004). Molecular characterization of novel P[14], G8 bovine group A rotavirus, Sun9, isolated in Japan. *Virus Res.* 105, 101-106.
- Gajardo, R.; Vende, P.; Poncet, D.; Cohen, J. (1997). Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J. Virol.* 71, 2211-2216.
- Galindo-Cardiel, I.; Fernández Jiménez, M.; Luján, L.; Buesa, J.; Espada, J.; Fantova, E.; Blanco, J.; Seaglés, J.; Badiola, J.J. (2011). Novel group A rotavirus G8P[1] as primary cause of an ovine diarrhetic syndrome outbreak in weaned lambs. *Vet. Microbiol.* 149, 467-471.
- Garaicoechea, L.; Bok, K.; Jones, L.R.; Combessies, G.; Odeón, A.; Fernández, F.; Parreño, V. (2006). Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Vet. Microbiol.* 118, 1-11.
- Garaicoechea, L.; Miño, S.; Ciarlet, M.; Fernández, F.; Barrandeguy, M.; Parreño, V. (2011). Molecular characterization of equine rotaviruses circulating in Argentinean foals during a 17-year surveillance period (1992-2008). *Vet. Microbiol.* 148, 150-160.
- García, M.I.; Labigne, A.; Le Bouguenec, C. (1994). Nucleotide Sequence of the Afimbrial-Adhesin-Encoding *afa-3* Gene Cluster and Its Translocation via Flanking IS1 Insertion Sequences. *J. Bacteriol.* 176, 7601-7613.
- García, A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Orden, J.A.; Cid, D.; Sanz, R.; Gómez-Bautista, M.; de La Fuente, R. (2000). Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrhetic dairy calves in Spain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 175-183.
- Gay, C.C.; Besser, T.E. (1994). *Escherichia coli* septicaemia in calves, pp 75-90. In: C.L. Gyles (Ed.). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wellingford, Oxfordshire, UK.

- Gentsch, J.R.; Woods, P.A.; Ramachandran, M.; Das, B.K.; Leite, J.P.; Alfieri, A.; Kumar, R.; Bhan, M.K.; Glass, R.I. (1996). Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 174, S30-S36.
- Gérardin, J.; Lalioui, L.; Jacquemin, E.; Le Bouguéneq, C.; Mainil, J.G. (2000). The *afa*-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the *afa-8* variant. *Vet. Microbiol.* 76, 175-184.
- Ghanbarpour, R.; Oswald, E. (2009). Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran. *Trop. Anim. Health. Prod.* 41, 1091-1099.
- Ghanbarpour, R.; Nazem, M.N. (2010). Prevalence of aerobactin and adhesin genes in *Escherichia coli* isolates from blood of bacteremic severely ill neonatal calves. *Vet. Arhiv.* 80, 185-194.
- Ghosh, S.; Gatheru, Z.; Nyangao, J.; Adachi, N.; Urushibara, N.; Kobayashi, N. (2011). Full genomic analysis of a G8P[1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event. *J. Med. Virol.* 83, 367-376.
- Gioffré, A.; Meichtri, L.; Miliwebsky, E.; Baschkier, A.; Chillemi, G.; Romano, M.I.; Sosa Estani, S.; Cataldi, A.; Rodríguez, R.; Rivas, M. (2002). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina: Evaluation of two procedures. *Vet. Microbiol.* 87, 301-313.
- Girardeau, J.P.; Der Vartanian, M.; Ollier, J.L.; Contrepolis, M. (1988). CS31A, a New K88-Related Fimbrial Antigen on Bovine Enterotoxigenic and Septicemic *Escherichia coli* Strains. *Infect. Immun.* 56, 2180-2188.
- Girardeau, J.P.; Bertin, Y.; Martin, C.; Der Vartanian, M.; Boeuf, C. (1991). Sequence Analysis of the *clpG* Gene, Which Codes for Surface Antigen CS31A Subunit: Evidence of an Evolutionary Relationship between CS31A, K88, and F41 Subunit Genes. *J. Bacteriol.* 173, 7673-7683.
- Girardeau, J.P.; Lalioui, L.; Said, A.M.O.; De Champs, C.; Le Bouguéneq, C. (2003). Extended Virulence Genotype of Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Carrying the *afa-8* Operon: Evidence of Similarities between Isolates from Humans and Animals with Extraintestinal Infections. *J. Clin. Microbiol.* 41, 218-226.
- Glock, R.D.; Miller, K. (1972). Septicemic Listeriosis in a Calf. *Iowa State University Veterinarian*, 34, 34-35.
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves, pp 19-39. In: S. Godden; S.M. McGuirk (eds.). Dairy Heifer Management. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 24. Elsevier Inc.
- González Pasayo, R.A.; Moreira, A.R. (2014). Caracterización genética de *Escherichia coli* enterotoxigénica aislada de bovino en Argentina. XX Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. San Miguel de Tucumán, Argentina. p 47.

- Gouvea, V.; Glass, R.I.; Woods, P.; Taniguchi, K.; Clark, H.F.; Forrester, B.; Fang, Z.Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276-282.
- Gouvea, V.; Santos, N.; Timenetsky, M. do C. (1994a). VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1333-1337.
- Gouvea, V.; Santos, N.; Timenetsky, M. do C. (1994b). Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1338-1340.
- Gouvea, V.; Brantly, M. (1995). Is rotavirus a population of reassortants?. *Trends in Microbiol.* 3, 159-162.
- Green, S.L.; Smith, L.L. (1992). Meningitis in neonatal calves: 32 cases (1983-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201, 125-128.
- Guenther, S.; Bethe, A.; Fruth, A.; Semmler, T.; Ulrich, R.G.; Wieler, L.H.; Ewers, C. (2012). Frequent Combination of Antimicrobial Multiresistance and Extraintestinal Pathogenicity in *Escherichia coli* Isolates from Urban Rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. *PLoS ONE* 7, 1-10.
- Gulati, B.R.; Nakagomi, O.; Koshimura, Y.; Nakagomi, T.; Pandey, R. (1999). Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from Indian diarrheic cow and buffalo calves. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2074-2076.
- Gulati, B.R.; Deepa, R.; Singh, B.K.; Rao, C.D. (2007). Diversity in Indian equine rotaviruses: identification of genotype G10, P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J. Clin. Microbiol.* 45, 972-978.
- Güler, L.; Gündüz, K.; Ok, Ü. (2008). Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. *Zoonoses Public Health* 55, 249-257.
- Gunn, A.A.; Naylor, J.A.; House, J.K. (2010). Diarrhea, pp 340-363. Manifestaciones y tratamiento de la enfermedad en rumiantes neonatos. *En: B. P. Smith (ed.). Medicina Interna de Grandes Animales (4th ed.). Elsevier, ES.*
- Gunning, R.E.; Wales, A.D.; Pearson, G.R.; Done, E., Cookson, A.L.; Woodward, M.J. (2001). Attaching and effacing lesions in the intestines of two calves associated with natural infection with *Escherichia coli* 026: H11. *Vet. Rec.* 148, 780-782.
- Gunzburg, S.T.; Tornieporth, N.G.; Riley, L.W. (1995). Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1375-1377.
- Gyles, C.L. (1993). *Escherichia coli*, pp 164-187. *In: C.L. Gyles; C.O. Thoen. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University Press, Ames, IA, US.*
- Gyles, C.L.; Fairbrother, J.M. (2010). *Escherichia coli*, pp 267-308. *In: C.L. Gyles; J.F. Prescott; J.G. Songer; C.O. Thoen (eds.). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (4th ed.). Wiley-Blackwell, Oxford, UK.*

- Haggard, D.L. (1995). Colibacilosis entética bovina, pp 63-80. *En*: E. Hunt (ed.). Diarrea del Ternero. *Clin. Vet. N. Am. Intermédica*, Buenos Aires, AR.
- Hall, G.A.; Reynolds, D.J.; Chanter, N.; Morgan, J.H.; Parsons, K.R.; Debney, T.G.; Bridger, J.C. (1985). Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. *Vet. Pathol.* 22, 156-163.
- Hall, G.A.; Bridger, J.C.; Parsons, K.R.; Cook, R. (1993). Variation in rotavirus virulence: a comparison of pathogenesis in calves between two rotaviruses of different virulence. *Vet. Pathol.* 30, 223-233.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hammami, S.; Castro, A.E.; Osburn, B.I. (1990). Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis, an enzyme-linked-immunosorbent assay, and an agglutination test for the direct identification of bovine rotavirus from feces and coelectrophoresis of viral RNA's. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 184-190.
- Harel, J.; Daigle, F.; Maiti, S.; Désautels, C.; Labigne, A.; Fairbrother, J.M. (1991). Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol. Lett.* 82, 177-182.
- Hariharan, H.; Bryenton, J.; Onge, J.S.; Heaney, S. (1992). Blood cultures from calves and foals. *Can. Vet. J.* 33, 56-57.
- Heckert, R.A.; Saif, L.J.; Hoblet, K.H.; Agnes, A.G. (1990). A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. *Vet. Microbiol.* 22, 187-201.
- Herrera-Luna, C.; Klein, D.; Lapan, G.; Revilla-Fernandez, S.; Haschek, B.; Sommerfeld-Stur, I.; Moestl, K.; Baumgartner, W. (2009). Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Vet. Med.- Czech* 54, 1-11.
- Hirsh, D.C. (1999). *Escherichia*, pp 69-74. *In*: D.C. Hirsh; Y.C. Zee (eds.) *Veterinary Microbiology* (1st. ed.). Blackwell Science, Inc., Malden, MA, US.
- Holland, R.E. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 345-375.
- Holland, R.E.; Wilson, R.A.; Holland, M.S.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Mullaney, T.P.; White, D.G. (1999). Characterization of *eae*+ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. *Vet. Microbiol.* 66, 251-263.
- Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, N.; Staley, J.; Williams, S. (eds.) (1994). Group 5: Facultatively anaerobic gram-negative rods, pp 175-289. *In*: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). William & Wilkins Editors, MD, US.
- Hoshino, Y.; Kapikian, A.Z. (2000). Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J. Health Popul. Nutr.* 18, 5-14.

- Huang, J.A.; Nagesha, H.S.; Snodgrass, D.R.; Holmes, I.H. (1992). Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 30, 85-92.
- Ianiro, G.; Delogu, R.; Bonomo, P.; Castiglia, P.; Ruggeri, F.M.; Fiore, L. (2014). Molecular characterization of human G8P [4] rotavirus strains in Italy: Proposal of a more complete subclassification of the G8 genotype in three major lineages. *Infect Genet. Evol.* 21, 129-133.
- ICTV (2008). International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponible en: http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-official/1230.aspx
- Isaacson, R.E. (1977). K99 surface antigen of *Escherichia coli*: purification and partial characterization. *Infect. Immun.* 15, 272-279.
- Ishizaki, H.; Sakai, T.; Shirahata, T.; Taniguchi, K.; Urasawa, T.; Urasawa, S.; Goto, H. (1996). The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. *Vet. Microbiol.* 48, 367-372.
- Iturriza-Gómara, M.; Kang, G.; Mammen, A.; Jana, A.K.; Abraham, M.; Desselberger, U.; Brown, D.; Gray, J. (2004). Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2541-2547.
- Izzo, M.M.; Kirkland, P.D.; Mohler, V.L.; Perkins, N.R.; Gunn, A.A.; House, J.K. (2011). Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 89, 167-173.
- Izzo, M.; Gunn, A.A.; House, J.K. (2015). Neonatal Diarrhea, pp 314-335. In: G. Smith (ed.). Large Animal Internal Medicine (5th ed.). Elsevier-Mosby, St. Louis, MO, US.
- Janke, B.H. (1989). Protecting calves from viral diarrhea. *Vet. Med.-US* 84, 803.
- Jerse, A.E.; Gicquelais, K.G.; Kaper, J.B. (1991). Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 59, 3869-3875.
- Johnson, J.R.; Russo, T.A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J. Lab. Clin. Med.* 139, 155-162.
- Johnson, J.R.; Gajewski, A.; Lesse, A.J.; Russo, T.A. (2003). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5798-5802.
- Kaba, J.; Kita, J.; Piwowarczyk, A.; Pawiński, J.; Witkowski, L. (2006). Epidemiology of neonatal calf diarrhea in large dairy herds. *Medycyna Weterynaryjna* 62, 665-668.
- Kaneene, J.B.; Hurd, H.S. (1990). The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. *Prev. Vet. Med.* 8, 127-140.
- Kaper, J.B.; Elliott, S.; Sperandio, V.; Perna, N.T.; Mayhew, G.F.; Blattner, F.R. (1998). Attaching-and-Effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement, pp 163-182. In: J.B. Kaper; A.D. O'Brien (eds.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington D.C., US.

- Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123-140.
- Kapikian, A.Z.; Chanock, R.M. (1996). Rotaviruses, pp 1657-1708. *In*: B.N. Fields; D.M. Knipe; P.M. Howley; R.M. Chanock; J.L. Melnick; T.P. Monath; B. Roizman; S.E. Straus (eds.). *Fields Virology* (3rd ed.). Raven Lippincott, Philadelphia, NY, US.
- Kapil, S.; Trent, A.M.; Goyal, S.M. (1990). Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. *Arch. Virol.* 115, 127-132.
- Kapil, S.; Pomeroy, K.A.; Goyal, S.M.; Trent, A.M. (1991). Experimental infection with a virulent pneumoenteric isolate of bovine coronavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 88-89.
- Kaplon, J.; Fremy, C.; Bernard, S.; Rehby, L.; Aho, S.; Pothier, P.; Ambert-Balay, K. (2013). Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. *Vaccine* 31, 2433-2440.
- Karch, H.; Meyer, T.; Rüssmann, H.; Heesemann, J. (1992). Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* 60, 3464-3467.
- Kireçci, E.; Ozkanlar, Y.; Aktas, M.S.; Uyanik, M.H.; Yazgi, H. (2010). Isolation of pathogenic aerobic bacteria from the blood of septicemic neonatal calves and the susceptibility of isolates to various antibiotics. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 81, 110-113.
- Kjelstrup, C.K.; Arnesen, L.P.S.; Granquist, E.G.; L'Abée-Lund, T.M. (2013). Characterization of *Escherichia coli* O78 from an outbreak of septicemia in lambs in Norway. *Vet. Microbiol.* 166, 276-280.
- Klein, D.; Kern, A.; Lapan, G.; Benetka, V.; Möstl, K.; Hassl, A.; Baumgartner, W. (2009). Evaluation of rapid assays for the detection of bovine coronavirus, rotavirus A and *Cryptosporidium parvum* in faecal samples of calves. *Vet. J.* 182, 484-486.
- Korzh, B.A.; Zlonkevich, Y.D.; Gevkan, I.I. (1990). Role of *Pseudomonas aeruginosa* in diseases of calves. *Veterinariya (Kiev)* 65, 37-41.
- Köhler, C.D.; Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 642-647.
- Lai, M.M.C.; Perlman, S.; Anderson, L.J. (2007). *Coronaviridae*, pp 1305-1335. *In*: D.M. Knipe; P.M. Howley; D.E. Griffin; R.A. Lamb; M.A. Martin; B. Roizman; S.E. Straus (eds.). *Fields Virology* (5th ed.). Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, NY, US.
- Lalioui, L.; Jouve, M.; Gounon, P.; Le Bouguenec, C. (1999). Molecular Cloning and Characterization of the afa-7 and afa-8 Gene Clusters Encoding Afimbrial Adhesins in *Escherichia coli* Strains Associated with Diarrhea or Septicemia in Calves. *Infect. Immun.* 67, 5048-5059.
- Lanz Uhde, F.L.; Kaufmann, T.; Sager, H.; Albin, S.; Zanoni, R.; Schelling, E.; Meylan, M. (2008). Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. *Vet. Rec.* 163, 362-366.

- Larralde, G.; Li, B.G.; Kapikian, A.Z.; Gorziglia, M. (1991). Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein. *J. Virol.* 65, 3213-3218.
- Larralde, G.; Gorziglia, M. (1992). Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J. Virol.* 66, 7438-7443.
- Larson, R.L.; Tyler, J.W. (2005). Reducing calf losses in beef herds. *Vet. Clin. Food Anim.* 21, 569-584.
- Lazo Pérez, L.; Dahbi, G.; Blanco Álvarez, M.; Blanco Álvarez, J.E.; Blanco Álvarez, J.; Llorens Blanco, F. (2009). Aplicación de técnicas moleculares en la caracterización de aislados de *Escherichia coli* procedentes de cerdos con síndrome diarreico en la provincia de Villa Clara. *Revista de Salud Animal* 31, 93-104.
- Le Bouguéneq C.; Archambaud, M.; Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1189-1193.
- Le Bouguéneq, C.; Bertin, Y. (1999). AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet. Res.* 30, 318-342.
- Lee, J.H.; Hur, J.; Stein, B.D. (2008). Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 in calves associated with diarrhea. *Vet. J.* 176, 205-209.
- Leomil, L.; Aidar-Ugrinovich, L.; Guth, B.E.C.; Irino, K.; Vettorato, M.P.; Onuma, D.L.; Pestana de Castro, A.P. (2003). Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Vet. Microbiol.* 97, 103-109.
- Levine, M.M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155, 377-389.
- Lindberg, F.P.; Lund, B.; Normark, S. (1984). Genes of pyelonephritogenic *E. coli* required for digalactoside-specific agglutination of human cells. *EMBO J.* 3, 1167.
- Linggood, M.A.; Roberts, M.; Ford, S.; Parry, S.H.; Williams, P.H. (1987). Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J. Gen. Microbiol.* 133, 835-842.
- Lintermans, P.F.; Bertels, A.; Schlicker, C.; Deboeck, F.; Charlier, G.; Pohl, P.; Norgren, M.; Normak, S.; Van Montagu, M.; De Greve, H. (1991). Identification, characterization, and nucleotide sequence of the F17-G gene, which determines receptor binding of *Escherichia coli* F17 fimbriae. *J. Bacteriol.* 173, 3366-3373.
- Lofstedt, J.; Dohoo, I.R.; Duizer, G. (1999). Model to predict septicemia in diarrheic calves. *J. Vet. Int. Med.* 13, 81-88.
- Louge Uriarte, E.L.; Parreño, V.; Badaracco, A.; Garaicoechea, L.; Späth, E.; Verna, A.E.; Leunda, M.R.; Fernández, F.; Saif, L.J.; Odeón, A.C. (2011) Detection of rotavirus genotypes and coronavirus among diarrheic and healthy beef and dairy calves from Buenos Aires Province, Argentina. Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD) Meeting- Chicago, IL, USA.

Louge Uriarte, E.L.; Moreira, A.R.; González Pasayo, R.; Cseh, S.; Tomazic, M.L.; Malena, R.; Weber, N.; Lischinsky, L.H.; Lloberas, M.M.; Schnittger, L.; Parreño, G.V.; Odeón, A.C. (2012). Caracterización microbiológica y molecular de agentes etiológicos asociados a un brote de diarrea neonatal en terneros de tambo. XIX Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. p 126.

Louge Uriarte, E.L.; Badaracco, A.; Matthijnsens, J.; Zeller, M.; Heylen, E.; Manazza, J.; Miño, S.; Van Ranst, M.; Odeón, A.; Parreño, V. (2014). The first caprine rotavirus detected in Argentina displays genomic features resembling virus strains infecting members of the *Bovidae* and *Camelidae*. *Vet. Microbiol.* 171, 189-197.

Louge Uriarte, E.L.; González Pasayo, R.; Morrell, E.; Malena, R.; Méndez, A.; Lischinsky, L.H.; Cseh, S.; Odeón, A.C.; Moreira, A.R. (2014). Septicemia y meningitis en terneros asociadas a *Escherichia coli* del filogrupa A con elevada virulencia y multiresistencia antibiótica. XX Reunión Científica y Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. 27, 28 y 29 de Noviembre de 2014. San Miguel de Tucumán.

Lucchelli, A.; Kang, S.Y.; Jayasekera, M.K.; Parwani, A.V.; Zeman, D.H.; Saif, L.J. (1994). A survey of G6 and G10 serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 175-181.

Maass, D.R.; Atkinson, P.H. (1994). Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues. *J. Virol.* 68, 366-378.

MacLachlan N.J.; Dubovi E.J. (2011) (eds.). *Coronaviridae*, pp 394-413. In: Fenner's Veterinary Virology. Academic Press, London, UK.

Maes, P.; Matthijnsens, J.; Rahman, M.; Van Ranst, M. (2009). RotaC: a webbased tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 9, 238.

Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T.; Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268-281.

Mainil, J.G.; Jacquemin, E.; Herault, F.; Oswald, E. (1997). Presence of pap-, sfa-, and afa-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. *Can. J. Vet. Res.* 61, 193.

Mainil, J. (1999). Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.*, 30, 235-257.

Mainil, J.G.; Jacquemin, E.; Pohl, P.; Fairbrother, J.M.; Ansuini, A.; Le Bouguéneq, C.; Ball, H. J.; De Rycke, J.; Oswald, E. (1999). Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. *Vet. Microbiol.* 70, 123-135.

Mainil, J.G.; Gerardin, J.; Jacquemin, E. (2000). Identification of the F17 fimbrial subunit-and adhesin-encoding (*f17A* and *f17G*) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Vet. Microbiol.* 73, 327-335.

- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 2-12.
- Malinen, E.; Kassinen, A.; Rinttilä, T.; Palva, A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149, 269-277.
- Manges, A.R.; Johnson, J.R.; Foxman, B.; O'Bryan, T.T.; Fullerton, K.E.; Riley, L.W. (2001). Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N. Engl. J. Med.* 345, 1007-1013.
- Manning, S.D. (2005). *Escherichia coli* infections, p 20. (1st. ed.) Chelsea House Publishers, Philadelphia, NY, US.
- Manuja, B.K.; Prasad, M.; Manuja, A.; Gulati, B.R.; Prasad, G. (2008). A novel genomic constellation (G10P[3]) of group A rotavirus detected from buffalo calves in northern India. *Virus Res.* 138, 36-42.
- Marchese, A.; Coppo, E.; Barbieri, R.; Zoppi, S.; Pruzzo, C.; Rossi, F.; Bergagna, S.; Dondo, A.; Debbia, E. (2012). Characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* causing septicemic colibacillosis in calves in Italy: emergence of a multiresistant O78 clonal group. *Microbial Drug Resist.* 18, 94-99.
- Margueritte, J.; Fumuso, E.; González, C.; Becaluba, M.; Biagioni, R.; Confalonieri, O.; Medina, L. (2001). Diarrheas neonatales en terneros de rodeos de cría. *Rev. Med. Vet.* 18, 517-533.
- Martella, V.; Decaro, N.; Pratelli, A.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. (2003). Variation of rotavirus antigenic specificity observed in a dairy herd over a long-term survey, pp 17-23. In: N. Kobayashi (ed.), *Molecular Epidemiology of Rotavirus*. Research Signpost, Trivandrum, IN.
- Martella, V.; Ciarlet, M.; Pratelli, A.; Arista, S.; Terio, V.; Elia, G.; Cavalli, A.; Gentile, M.; Decaro, N.; Greco, G.; Cafiero, M.A.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. (2003). Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5665-5675.
- Martella, V.; Bányai, K.; Matthijssens, J.; Buonavoglia, C.; Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 140, 246-255.
- Martínez, J.L.; Delgado-Iribarren, A.; Baquero, F. (1990). Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 75, 45-56.
- Masuda, T.; Nagai, M.; Yamasato, H.; Tsuchiaka, S.; Okazaki, S.; Katayama, Y.; Oba, M.; Nishiura, N.; Sassa, Y.; Omatsu, T.; Furuya, T.; Koyama, S.; Shirai, J.; Taniguchi, K.; Fujii, Y.; Todaka, R.; Katayama, K.; Mizutani, T. (2014). Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet. Microbiol.* 171, 66-73.
- Matsuda, Y.; Isegawa, Y.; Woode, G.N.; Zheng, S.; Kaga, E.; Nakagomi, T.; Ueda, S.; Nakagomi, O. (1993). Two-way cross-neutralization mediated by a shared P (VP4) serotype between bovine rotavirus strains with distinct G (VP7) serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 31, 354-358.

- Matthijnssens, J.; Ciarlet, M.; Heiman, E.; Arijs, I.; Delbeke, T.; McDonald, S.M.; Palombo, E.A.; Iturriza-Gómara, M.; Maes P.; Patton J.T.; Rahman M.; Van Ranst, M. (2008a). Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 82, 3204-3219.
- Matthijnssens, J.; Ciarlet, M.; Rahman, M.; Attoui, H.; Bányai, K.; Estes, M.K.; Gentsch, J.R.; Iturriza-Gómara, M.; Kirkwood, C.D.; Martella, V.; Mertens, P.P.; Nakagomi, O.; Patton, J.T.; Ruggeri, F.M.; Saif, L.J.; Santos, N.; Steyer, A.; Taniguchi, K.; Desselberger, U.; Van Ranst, M. (2008b). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153, 1621-1629.
- Matthijnssens, J.; Potgieter, A.C.; Ciarlet, M.; Parreño, V.; Martella, V.; Bányai, K.; Garaicoechea, L.; Palombo, E.A.; Novo, L.; Zeller, M.; Arista, S.; Gerna, G.; Rahman, M.; Van Ranst, M. (2009). Are Human P[14] Rotavirus Strains the Result of Interspecies Transmissions from Sheep or Other Ungulates That Belong to the Mammalian Order *Artiodactyla*?. *J. Virol.* 86, 2917-2929.
- Matthijnssens, J.; Taraporewala, Z.F.; Yang, H.; Rao, S.; Yuan, L.; Cao, D.; Hoshino, Y.; Mertens, P.P.; Carner, G.R.; McNeal, M.; Sestak, K.; Van Ranst, M.; Patton, J.T. (2010). Simian rotaviruses possess divergent gene constellations originating from interspecies transmission and reassortment. *J. Virol.* 84, 2013–2026.
- Matthijnssens, J.; Ciarlet, M.; McDonald, S.M.; Attoui, H.; Bányai, K.; Brister, J.R.; Buesa, J.; Esona, M.D.; Estes, M.K.; Gentsch, J.R.; Iturriza-Gómara, M.; Johne, R.; Kirkwood, C.D.; Martella, V.; Mertens, P.P.; Nakagomi, O.; Parreño, V.; Rahman, M.; Ruggeri, F.M.; Saif, L.J.; Santos, N.; Steyer, A.; Taniguchi, K.; Patton, J.T.; Desselberger, U.; Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397-1413.
- Matthijnssens, J.; Miño, S.; Papp, H.; Potgieter, C.; Novo, L.; Heylen, E.; Zeller, M.; Garaicoechea, L.; Badaracco, A.; Lengyel, G.; Kisfali, P.; Cullinane, A.; Collins, P.L.; Ciarlet, M.; O’Shea, H.; Parreño, V.; Bányai, K.; Barrandeguy, M.; Van Ranst, M. (2012). Complete molecular genome analyses of equine rotavirus A strains from different continents reveal several novel genotypes and a largely conserved genotype constellation. *J. Gen. Virol.* 93, 866-875.
- Mattion, N.M.; Cohen, J.; Aponte, C.; Estes, M.K. (1992). Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology* 190, 68-83.
- Mattion, N.M.; Cohen, J.; Estes, M.K. (1994). The rotavirus protein, pp 169-249. *In: A.Z. Kapikian (ed.). Viral infections of the gastrointestinal tract (2nd Ed.). Marcel Dekker, NY, US.*
- Mayameei, A.; Mohammadi, G.; Yavari, S.; Afshari, E., Omidi, A. (2010). Evaluation of relationship between Rotavirus and Coronavirus infections with calf diarrhea by capture ELISA. *Comp. Clin. Path.* 19, 553-557.
- McDaniel, T.K.; Jarvis, K.G.; Donnenberg, M.S.; Kaper, J.B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 1664-1668.

- McNulty, M.S.; McFerran, J.B.; Bryson, D.G.; Logan, E.F.; Curran, W.L. (1976). Studies on rotavirus infection and diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.* 99, 229.
- McNulty, M.S.; Bryson, D.G.; Allan, G.M.; Logan, E.F. (1984). Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Vet. Microbiol.* 9, 425-434.
- Mebus, C.A.; Underdahl, N.R.; Rhodes, M.B.; Twiehaus, M.J. (1969). Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ. Nebr. Res. Bull.* 233, 1-16.
- Mebus, C.A.; Stair, E.L.; Rhodes, M.B.; Twiehaus, M.J. (1973). Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation, and characterization of a coronavirus-like agent. *Am. J. Vet. Res.* 34, 145-150.
- Medici, M.C.; Abelli, L.A.; Martinelli, M.; Dettori, G.; Chezzi, C. (2008). Molecular characterization of VP4, VP6 and VP7 genes of a rare G8P [14] rotavirus strain detected in an infant with gastroenteritis in Italy. *Virus Res.* 137, 163-167.
- Mee, J.F. (2008). Newborn dairy calf management, pp 1-17. In: S. Gooden; S.M. McGuirk (eds.). Dairy Heifer Management. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 24.
- Mercado, E.C.; Rodríguez, S.M.; D'Antuono, A.L.; Cipolla, A.L.; Elizondo, A.M.; Rossetti, C.A.; Malena, R.; Méndez, M.A. (2003). Occurrence and Characteristics of CS31A Antigen-Producing *Escherichia coli* in Calves with Diarrhoea and Septicaemia in Argentina. *J. Vet. Med. Ser. B* 50, 8-13.
- Mercado, E.C.; Gioffré, A.; Rodríguez, S.M.; Cataldi, A.; Irino, K.; Elizondo, A.M.; Cipolla, A.L.; Romano, M.I.; Malena, R.; Méndez, M.A. (2004). Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Isolated from Diarrhoeic Calves in Argentina. *J. Vet. Med. B.* 51, 82-88.
- Midgley, S.E.; Hjulsager, C.K.; Larsen, L.E.; Falkenhorst, G.; Böttiger, B. (2012). Suspected zoonotic transmission of rotavirus group A in Danish adults. *Epidemiol. Infect.* 140, 1013-1017
- Midgley, S.E.; Bányai, K.; Buesa, J.; Halaihel, N.; Hjulsager, C.K.; Jakab, F.; Kaplon, J.; Larsen, L.E.; Monini, M.; Poljšak-Prijatelj, M.; Pothier, P.; Ruggeri, F.M.; Steyer, A.; Koopmans, M.; Böttiger, B. (2012). Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* 156, 238-245.
- Millemann, Y. (2009). Diagnosis of neonatal calf diarrhoea. *Revue Méd. Vét.* 160, 404-409.
- MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca) (2012). Subsecretaría de Lechería. Estadísticas. Disponible en internet: http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estad%C3%ADsticas/index.php
- MAA (Ministerio de Asuntos Agrarios) (2013). Dirección Provincial de Ganadería. Disponible en internet: http://www.maa.gba.gov.ar/dir_ganaderia/lecheria.php
- Miyazaki, A.; Kuga, K.; Suzuki, T.; Kohmoto, M.; Katsuda, K.; Tsunemitsu, H. (2011). Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. *Vet. Res.* 42, 1-10.

- Mohammad, A.; Peiris, J.S.M.; Wijewanta, E.A.; Mahalingam, S.; Gunasekara, G. (1985). Role of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle and buffalo calf diarrhoea. *FEMS Microbiol. Lett.* 26, 281-283.
- Mokady, D.; Gophna, U.; Ron, E.Z. (2005a). Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 66-73.
- Mokady, D.; Gophna, U.; Ron, E.Z. (2005b). Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 455-462.
- Monini, M.; Cappuccini, F.; Battista, P.; Falcone, E.; Lavazza, A.; Ruggeri, F.M. (2008). Molecular characterization of bovine rotavirus strains circulating in northern Italy, 2003–2005. *Vet. Microbiol.* 129, 384-389.
- Montgomerie, J.Z.; Bindereif, A.; Neilands, J.B.; Kalmanson, G.M.; Guze, L.B. (1984). Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infect. Immun.* 46, 835-838.
- Moon, H.W.; Whipp, S.C.; Skartvedt, S.M. (1976). Etiologic diagnosis of diarrheal disease of calves: frequency and methods for detecting enterotoxin and K99 antigen production by *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* 37, 1025-1029.
- Moon, H.W.; Whipp, S.C.; Argenzio, R.A.; Levine, M.M.; Giannella, R.A. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 41, 1340-1351.
- Mora, A.; Herrera, A.; López, C.; Dahbi, G.; Mamani, R.; Pita, J.M.; Alonso, M.P.; Llovo, J.; Bernárdez, M.I.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Blanco, J. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int. Microbiol.* 14, 121-141.
- Morgan, J. (1990). Epidemiology, diagnosis and control of undifferentiated calf diarrhoea. *In Practice* 12, 17-20.
- Morrell, E.L.; Moore, D.P.; Odeón, A.C.; Poso, M.A.; Odriozola, E.; Cantón, G.; Paolicchi, F.; Malena, R.; Leunda, M.R.; Morsella; Campero, C.M. (2008). Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from INTA Balcarce, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 40, 151-157.
- Moxley, R.A.; Francis, D.H. (1986). Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect. Immun.* 53, 339-346.
- Moxley, R.A.; Smith, D.R. (2010). Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *Vet. Clin. N. Am.-Food A.*, 26, 29-56.
- Mukherjee, A.; Nayak, M.K.; Roy, T.; Ghosh, S.; Naik, T.N.; Kobayashi, N.; Chawla-Sarkar, M. (2012). Detection of human G10 rotavirus strains with similarity to bovine and bovine-like equine strains from untypable samples. *Infect. Genet. Evol.* 12, 467-470.
- Murphy, F.A.; Gibbs, E.P.J.; Horzinek, M.C.; Studdert, M.J. (1999) (eds.). *In: Reoviridae*, pp 391-404. Veterinary virology. Academic Press, San Diego, CA, US.

- Myers, L.L.; Guinée, P.A. (1976). Occurrence and characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Infect. Immun.* 13, 1117-1119.
- Myers, L.L.; Firehammer, B.D.; Border, M.M.; Shoop, D.S. (1984). Prevalence of enteric pathogens in the feces of healthy beef calves. *Am. J. Vet. Res.* 45, 1544-1548.
- Naylor, S.W.; Gally, D.L.; Low, J.C. (2005). Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 419-441.
- Nakagomi, T.; Nakagomi, O.; Dove, W.; Doan, Y.H.; Witte, D.; Ngwira, B.; Todd, S.; Steele, A.D.; Neuzil, K.M.; Cunliffe, N.A. (2012). Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. *Vaccine* 30, A140-A151.
- Nataro, J.P.; Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
- Nagy, B. (1980). Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxic colibacillosis. *Infect. Immun.* 27, 21-24.
- Nagy, B.; Fekete, P.Z. (1999). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30, 259-284.
- Nagy, B.; Fekete, P.Z. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 443-454.
- Nagy, B.; Tóth, I.; Fekete, P.Z. (2005). Adhesins and receptors for colonisation by different pathotypes of *Escherichia coli* in calves and young pigs, pp 157-190. In: Holzapfel, W.; Naughton P. (eds.). *Microbial ecology of the growing animal*. Elsevier Health Science, Amsterdam, NL.
- Neilands, J.B. (1990). Molecular biology and regulation of iron acquisition by *Escherichia coli* K-12, pp 205-223. In: B.H. Iglewski; V.L. Clark (eds.). *Molecular basis of bacterial pathogenesis*. Academic Press, San Diego, CA, US.
- Nguyen, T.D.; Vo, T.T.; Vu-Khac, H. (2011). Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J. Vet. Sci.* 12, 159-164.
- Nicolet, J. (1985). *Enterobacteriaceae*, pp 1-30. En: *Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria*. (3ra. ed.). Panamericana. Buenos Aires, AR.
- Odeón, A.C. (1980). Diarrea neonatal de los terneros en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina), aspectos epidemiológicos, etiológicos, inmunológicos y patológicos. Doctor en Ciencias Veterinarias. La Plata, Argentina. Universidad Nacional de La Plata.
- Ok, M.; Güler, L.; Turgut, K.; Ok, Ü.; Şen, I.; Gündüz, I.K.; Birdane, M.F.; Güzelbekteş, H. (2009). The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses Public Health* 56, 94-101.
- Okada, N.; Matsumoto, Y. (2002). Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. *Vet. Microbiol.* 84, 297-305.

- Orden, J.A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Cid, D.; García, S.; Sanz, R.; de la Fuente, R. (1998). Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1–30-days-old diarrhoeic dairy calves. *Vet. Microbiol.* 63, 239-248.
- Orden, J.A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Cid, D.; García, S.; de La Fuente, R. (1999). Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Vet. Microbiol.* 66, 265-273.
- Ordoqui, M.S.; Mogni, F.; Hervias, D. (2012). Características de la producción lechera argentina. Apuntes Agroeconómicos. Fac. de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Año 1, Nro.2. Trabajo completo.
- Ørskov, F.; Ørskov, I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* 38, 699-704.
- Osek, J.; Gallien, P.; Protz, D. (2000). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 267-276.
- Oswald, E.; De Rycke, J.; Lintermans, P.; Van Muylem, K.; Mainil, J.; Daube, G.; Pohl, P. (1991). Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2522-2527.
- Palombo, E.A. (2002). Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes* 24, 11-20.
- Papp, H.; László, B.; Jakab, F.; Ganesh, B.; De Grazia, S.; Matthijssens, J.; Ciarlet, M.; Martella, V.; Bányai, K. (2013). Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165, 190-199.
- Parashar, U.D.; Gibson, C.J.; Bresse, J.S.; Glass, R.I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 304-306.
- Park, S.J.; Kim, G.Y.; Choy, H.E.; Hong, Y.J.; Saif, L.J.; Jeong, J.H.; Park, S.I.; Kim, H.H.; Kim, S.K.; Shin, S.S.; Kang, M.I.; Cho, K.O. (2007). Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Arch. Virol.* 152, 1885-1900.
- Parma, A.E. (2007). *Escherichia*, pp 197-202. En: O.N. Stanchi; P.E. Martino; E. Gentilini; H.E. Reinoso; M.G. Echeverría; N.A. Leardini; J.A. Copes (eds.). Microbiología Veterinaria. Intermédica, Buenos Aires, AR.
- Parra, G.I.; Vidales, G.; Gómez, J.A.; Fernández, F.M.; Parreño, V.; Bok, K. (2008). Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. *Vet. Microbiol.* 126, 243-250.
- Parreño, V.; Costantini, V.; Cheetham, S.; Blanco Viera, J.; Saif, L.J.; Fernández, F.; Leoni, L.; Schudel, A. (2001). First isolation of rotavirus associated with neonatal diarrhoea in guanacos (*Lama guanicoe*) in the Argentinean Patagonia region. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48, 713-720.

- Parreño, V.; Bejar, C.; Vagnozzi, A.; Barrandeguy, M.; Costantini, V.; Craig, M.I.; Yuan, L.; Hodgins, D.; Saif, L.; Fernández, F. (2004). Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 100, 7–24.
- Parreño, V.; Marcoppido, G.; Vega, C.; Garaicoechea, L.; Rodríguez, D.; Saif, L.; Fernández, F. (2010). Milk supplemented with immune colostrum: Protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 12-27.
- Parwani, A.V.; Hussein, H.A.; Rosen, B.I.; Lucchelli, A.; Navarro, L.; Saif, L.J. (1993). Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type-specific cDNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2010-2015.
- Pastoret, P.P.; Schwers, A.; Vanden Broecke, C.; Wérenne, J. (1984). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 3, 843-853.
- Paton, J.C.; Paton, A.W. (1998a). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.
- Paton, A.W.; Paton, J.C. (1998b). Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598-602.
- Paul, P.S.; Lyoo, Y.S. (1993). Immunogens of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 37, 299-317.
- Penteado, A.S.; Ugrinovich, L.A.; Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Andrade, J.R. C.; Corrêa, S.S.; Pestana de Castro, A.F. (2002). Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Vet. Microbiol.* 89, 41-51.
- Pérez, E.; Kummeling, A.; Janssen, M.M.H.; Jiménez, C.; Alvarado, R.; Caballero, M.; Donado P.; Dwinger, R.H. (1998). Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilarán, Costa Rica. *Prev. Vet. Med.* 33, 195-205.
- Pérez-Vargas, J.; Isa, P.; López, S.; Arias, C.F. (2006). Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. *Arch. Med. Res.* 37, 1-10.
- Pesavento, J.B.; Crawford, S.E.; Estes, M.K.; Prasad, B.V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly, pp 189-219. In: R. Polly (ed.). *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, DE.
- Phan, T.G.; Khamrin, P.; Quang, T.D.; Dey, S.K.; Takanashi, S.; Okitsu, S.; Maneekarn, N.; Ushijima, H. (2007). Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J. Virol.* 81, 4645-4653.
- Picco, N.Y.; Alustiza, F.E.; Bellingeri, R.V.; Grosso, M.C.; Motta, C.E.; Larriestra, A.J.; Vissio, C.; Tiranti, K.I.; Terzolo, H.R.; Moreira, A.R.; Vivas, A.B. (2015). Detección molecular de cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas de terneros neonatos de tambo en la provincia de Córdoba, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 47, 95-102.

- Pohl, P.; Daube, G.; Mainil, J.; Lintermans, P.; Kaeckenbeeck, A.; Oswald, E. (1992). Facteurs de virulence et phénotypes de soixante et une souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine, productrices de la toxine cytotoxique nécrosante de type 1 (CNF 1). *Annales de recherches vétérinaires*. 23, 83-91.
- Pohl, P.; Oswald, E.; Van Muylem, K.; Jacquemin, E.; Lintermans, P.; Mainil, J. (1993). *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet. Res.* 24, 311-315.
- Pongsuwanna, Y.; Taniguchi, K.; Chiwakul, M.; Urasawa, T.; Wakasugi, F.; Jayavas, C.; Urasawa, S. (1996). Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. *J. Clin. Microbiol* 34, 1050-1057.
- Pospischil, A.; Mainil, J.G.; Baljer, G.; Moon, H.W. (1987). Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and cats with diarrhea. *Vet. Pathol.* 24, 330-334.
- Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.; Carter, G.R. (eds.) (1994). *Enterobacteriaceae*, pp 226-234. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby Wolfe, London, UK.
- Quiroz García, J.L.; Ruiz, G (2012). Seguimiento en crianza artificial de terneros. INTA. Disponible en internet: <http://inta.gob.ar/documentos/seguimiento-en-crianza-artificial-de-terneros/>
- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W.; Constable, P.D. (eds.) (2007). Diseases of the newborn, pp 127-171. In: *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Saunders Elsevier.
- Ramani, S.; Iturriza-Gomara, M.; Jana, A.K.; Kuruvilla, K.A.; Gray, J.J.; Brown, D.W.; Kang, G. (2009). Whole genome characterization of reassortant G10P[11] strain (N155) from a neonate with symptomatic rotavirus infection: identification of genes of human and animal rotavirus origin. *J. Clin. Virol.* 45, 237-244.
- Ramos, A.P.D.; Stefanelli, C.C.; Linhares, R.E.C.; de Brito, B.G.; Santos, N.; Gouvea, V.; de Cassia Lima, R.; Nozawa, C. (2000). The stability of porcine rotavirus in feces. *Vet. Microbiol.* 71, 1-8.
- Ramos, N.L.; Saayman, M.L.; Chapman, T.A.; Tucker, J.R.; Smith, H.V.; Faoagali, J.; Chin, J.C.; Brauner, A.; Katouli, M. (2010). Genetic relatedness and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from septicaemic and uroseptic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 15-23.
- Reidy, N.; Lennon, G.; Fanning, S.; Power, E.; O'Shea, H. (2006). Molecular characterisation and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002–2004. *Vet. Microbiol.* 117, 242-247.
- Rey, J.; Sánchez, S.; Blanco, J.E.; Hermoso de Mendoza, J.; Hermoso de Mendoza, M.; García, A.; Gil, C.; Tejero, N.; Rubio, R.; Alonso, J.M. (2006). Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 212-217.

- Reynolds, D.J.; Debney, T.G.; Hall, G.A.; Thomas, L.H.; Parsons, K.R. (1985). Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. *Arch. Virol.* 85, 71-83.
- Reynolds, D.J.; Morgan, J.H.; Chanter, N.; Jones, P.W.; Bridger, J.C.; Debney, T.G.; Bunch, K.J. (1986). Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet. Rec.* 119, 34-39.
- Rigobelo, E.C.; Gamez, H.J.; Marin, J.M.; Macedo, C.; Ambrosin, J.A.; Ávila, F.A.D. (2006). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arq. Bras. Med Vet Zootec.* 58, 305-310.
- Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Deza, N.; Leotta, G.A. (2006). Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina*, 66, 27-32.
- Rodríguez, D.; Garaicoechea, L.; Combessies, G.; Odeón, A.; Venzano, A.; Saif, L.J.; Fernández, F.; Parreño, V. (2006). Epidemiología de la diarrea neonatal asociada a CVB en terneros de la Republica Argentina en un período de 12 años (1994-2005). XXVI Reunión Anual Científica de la Sociedad Argentina de Virología (SAV). Vaquerías, Córdoba, Argentina.
- Rodríguez-Limas, W.A.; Flores-Samaniego, B.; de la Mora, G.; Ramírez, O.T.; Palomares, L.A. (2009). Genotypification of bovine group A rotavirus in Mexico. *Vaccine* 27, 6411-6414.
- Ron, E.Z. (2006). Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 28-32.
- Rossanigo, C.; Arano, A. (2012). Stock 2012 del Ganado Bovino. Mapas de Existencias e Indicadores Ganaderos. pp. 3-17. Ediciones INTA, San Luis, AR.
- Russo, T.A.; Johnson, J.R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181, 1753-1754.
- Sáenz, Y.; Briñas, L.; Domínguez, E.; Ruiz, J.; Zarazaga, M.; Vila, J.; Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3996-4001.
- Saif, L.J.; Redman, D.R.; Smith, K.L.; Theil, K.W. (1983). Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows. *Infect. Immun.* 41, 1118-1131.
- Saif, L.J.; Redman, D.R.; Moorhead, P.D.; Theil, K.W. (1986). Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1426-1432.
- Saif, L.J.; Rosen, B.I.; Parwani, A.V. (1994). Animal rotaviruses, pp 289–314. In: A.Z. Kapikian (ed.). *Viral infections of the gastrointestinal tract* (2nd ed.) Marcel Dekker, NY, US.
- Saif, L.J. (2008). Coronaviruses of Domestic Livestock and Poultry: Interspecies Transmission, Pathogenesis, and Immunity, pp 279-298. In: S. Perlman; T. Gallagher; E. Snijder (eds.). *Nidoviruses*. ASM Press, Washington, US.

- Saitou, N.; Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Salvadori, M.R.; Valadares, G.F.; Leite, D.D.S.; Blanco, J.; Yano, T. (2003). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 34, 230-235.
- Santos, N.; Lima, R.C.; Pereira, C.F.; Gouvea, V. (1998). Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2727-2729.
- Santos, N.; Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15, 29-56.
- Sanz, M.E.; Viñas, M.R.; Parma, A.E. (1998). Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *Eur. J. Epidemiol.* 14, 399-403.
- Sanz, M.E. (1999). Detección de factores de virulencia en *Escherichia coli* toxigénicas y estudio de su incidencia en Salud Pública y Sanidad Animal. Doctor en Ciencia Animal. Tandil, Argentina. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 100 p.
- Sánchez, C.; Suero, M.; Castignani, H.; Terán, J.C.; Marino, M. (2012). La lechería argentina: estado actual y su evolución (2008 a 2011). 47th. Reunión Anual de la Asociación Argentina de Economía Agraria. Corrientes, Argentina. Trabajo completo 15 p.
- Saridakis, H.O.; El Gared, S.A.; Vidotto, M.C.; Guth, B.E. (1997). Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. *Vet. Microbiol.* 54, 145-153.
- Sato, M.; Nakagomi, T.; Tajima, K.; Ezura, K.; Akashi, H.; Nakagomi, O. (1997). Isolation of serotype G8, P6[1] bovine rotavirus from adult cattle with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1266-1268.
- Scheutz, F.; Beutin, L.; Smith, H.R. (2001) Clinical detection of verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC), pp. 447–452. In: Duffy, G.; Garvey, P.; McDowell, D.A. (eds.). Verocytotoxigenic *E. coli*. Food and Nutrition Press, Inc. Blackwell Publishing, Trumbull, CT, US.
- Scheutz, F.; Teel, L.D.; Beutin, L.; Piérard, D.; Buvens, G.; Karch, H.; Mellmann, A.; Caprioli, A.; Tozzoli, R.; Morabito, S.; Strockbine, N.A.; Melton-Celsa, A.R.; Sanchez, M.; Persson, S.; O'Brien, A.D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2951-2963.
- Schierack, P.; Walk, N.; Ewers, C.; Wilking, H.; Steinrück, H.; Filter, M.; Wieler, L.H. (2008). ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Environ. Microbiol.* 10, 1742-1751.
- Schmidt, H.; Beutin, L.; Karch, H. (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. 1995. *Infect. Immun.* 63, 1055-61.
- Schmidt, M.A. (2010). LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell. Microbiol.* 12, 1544-1552.

- Schoondermark-van de Ven, E.; Van Ranst, M.; de Bruin, W.; van den Hurk, P.; Zeller, M.; Matthijssens, J.; Heylen, E. (2013). Rabbit colony infected with a bovine-like G6P[11] rotavirus strain. *Vet. Microbiol.* 166, 154-164.
- Schoonderwoerd, M.; Clarke, R.C.; Van Dreumel, A.A.; Rawluk, S.A. (1988). Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O111: NM. *Can. J. Vet. Res.* 52, 484-487.
- Scott, P.R.; Hall G.A.; Jones; P.W.; Morgan J.H. (2004). Calf Diarrhoea, pp. 185-213. In: H. Andrews; R.W. Blowey; H. Boyd; R.G. Eddy (eds.). *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK.
- Sherwood, D.; Snodgrass, D.R.; Lawson, G.H. (1983). Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves in Scotland and northern England. *Vet. Rec.* 113, 208-212.
- Shimizu, M.; Sakano, T.; Yamamoto, J.; Kitajima, K. (1987). Incidence and some characteristics of fimbriae FY and 31A of *Escherichia coli* isolates from calves with diarrhea in Japan. *Microbiol. Immunol.* 31, 417-426.
- Smith, D.R.; Tsunemitsu, H.; Heckert, R.A.; Saif, L.J. (1996). Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of bovine coronavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 99-105.
- Smith, J.L.; Fratamico, P.M.; Gunther, N.W. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 134-163
- Smith, D.R. (2012). Field disease diagnostic investigation of neonatal calf diarrhea, pp 465-481. In: V.L. Cooper (ed.). *Diagnostic Pathology*. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 28. Elsevier Inc.
- Snodgrass, D.R.; Smith, M.L.; Krautil, F.L. (1982). Interaction of rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* in conventionally-reared dairy calves. *Vet. Microbiol.* 7, 51-60.
- Snodgrass, D.R.; Terzolo, H.R.; Sherwood, D.; Campbell, I.; Menzies, J.D.; Synge, B.A. (1986). Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.* 119, 31-34.
- Snodgrass, D.R.; Fitzgerald, T.; Campbell, I.; Scott, F.M.; Browning, G.F.; Miller, D.L.; Herring A.J.; Greenberg, H.B. (1990). Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 28, 504-507.
- Späth, E.J.A.; Entrocasso, C.M.; Plorutti, F.; Manazza, J.A.; Brusca, G.; Faverin, C. (eds.) (2012). *En: Enfermedades de los bovinos diagnosticadas por veterinarios en el centro-sur de Buenos Aires. Años 2001 al 2007*, pp 7-32. Boletín técnico Nro. 161. Ediciones INTA, Balcarce, AR.
- Steyer, A.; Sagadin, M.; Kolenc, M.; Poljšak-Prijatelj, M. (2013). Whole genome sequence analysis of bovine G6P[11] rotavirus strain found in a child with gastroenteritis. *Infect. Genet. Evol.* 13, 89-95.
- Stordeur, P.; China, B.; Charlier, G.; Roels, S.; Mainil, J. (2000). Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves. *Microbes Infect.* 2, 17-24.

- Stupka, J.A.; Degiuseppe, J.I.; Parra, G.I. (2012). Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008–2009: whole-genome characterization of emerging G12P [8] strains. *J. Clin. Virol.* 54, 162-167.
- Swiatek, D.L.; Palombo, E.A.; Lee, A.; Coventry, M.J.; Britz, M.L.; Kirkwood, C.D. (2010a). Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. *Vet. Microbiol.* 140, 56-62.
- Swiatek, D.L.; Palombo, E.A.; Lee, A.; Coventry, M.J.; Britz, M.L.; Kirkwood, C.D. (2010b). Characterisation of G8 human rotaviruses in Australian children with gastroenteritis. *Virus Res.* 148, 1–7.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tewari, R.; Ikeda, T.; Malaviya, R.; MacGregor, J.I.; Little, J.R.; Hultgren, S.J.; Abraham, S.N. (1994). The PapG tip adhesin of P fimbriae protects *Escherichia coli* from neutrophil bactericidal activity. *Infect. Immun.* 62, 5296-5304.
- Thrusfield, M. (2005) (Ed.). Surveys, pp 228-246. *In: Veterinary Epidemiology* (3rd. ed.). Blackwell Science Ltd, Padstow, Cornwall, UK.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Torres-Medina, A. (1984). Effect of combined rotavirus and *Escherichia coli* in neonatal gnotobiotic calves. *Am. J. Vet. Res.* 45, 643-651.
- Torres-Medina, A.; Schlafer, D.H.; Mebus, C.A. (1995). Diarrea por rotavirus y coronavirus, pp 33-61. *En: E. Hunt (ed.). Diarrea del Ternero. Clin. Vet. N. Am.* Intermédica, Buenos Aires, AR.
- Toth, I.; Herault, F.; Beutin, L.; Oswald, E. (2003). Production of Cytolethal Distending Toxins by Pathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Human and Animal Sources: Establishment of the Existence of a New *cdt* Variant (Type IV). *J. Clin. Microbiol.* 41:4285-91.
- Tzipori, S. (1981a). The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. *Vet. Rec.* 108, 510-514.
- Tzipori, S.R.; Makin, T.J.; Smith, M.L.; Krautil, F.L. (1981b). Clinical Manifestations of Diarrhea in Calves Infected with Rotavirus and Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 13, 1011-1016.
- USDA. (2008). Dairy 2007, pp 57–61. Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle Industry, 1991-2007. USDA-APHIS-VS, CEAH. Fort Collins, CO, US.
- Uzal, F.A.; Plattner, B.L.; Hostetter, J.M. (2016) Alimentary system, pp 1–257. *In: M.G. Maxie, (ed.). Jubb, Kennedy, and Palmer’s pathology of domestic animals* (6th ed.). Elsevier, St Louis, MO, USA.

- Vadillo Machota, S.; Jiménez, R.; Píriz, S. (2002). Estructura y función de la célula bacteriana, pp 13-33. *En*: Vadillo Machota, S.; Píriz Durán, S.; Mateos Yanes, E. (eds.). *Manual de Microbiología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, ES.
- Valat, C.; Forest, K.; Auvray, F.; Métayer, V.; Méheut, T.; Polizzi, C.; Gay, E.; Haenni, M.; Oswald, E. Madec, J. Y. (2014). Assessment of Adhesins as an Indicator of Pathovar-Associated Virulence Factors in Bovine *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7230-7234.
- Van Bost, S.; Roels, S.; Mainil, J. (2001a). Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. *Vet. Microbiol.* 81, 315-329.
- Van Bost, S.; Bâbe, M.H.; Jacquemin, E.; Mainil, J. (2001b). Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. *Vet. Microbiol.*, 82, 311-320.
- Van Bost, S.; Roels, S.; Oswald, E.; Mainil, J. (2003). Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2) strains in calves. *Microbes Infect.* 5, 1189-1193.
- Van der Heide, R.; Koopmans, M.P.G.; Shekary, N.; Houwers, D.J.; Van Duynhoven, Y.T.H.P.; Van der Poel, W.H.M. (2005). Molecular characterizations of human and animal group A rotaviruses in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 43, 669-675.
- Van Metre, D.C.; Tennant, B.C.; Whitlock, R.H. (2008). Infectious diseases of the gastrointestinal tract, pp 200-294. *In*: T.J. Divers; S.F. Peek (eds.). *Diseases of dairy cattle* (2 nd. ed.). Saunders, St. Louis, MO, US.
- Varshney, K.C.; Bridger, J.C.; Parsons, K.R.; Cook, R.; Teucher, J.; Hall, G.A. (1995). The lesions of rotavirus infection in 1-and 10-day-old gnotobiotic calves. *Vet. Pathol.* 32, 619-627.
- Varshney, B.; Jagannath, M.R.; Vethanayagam, R.R.; Kodhandharaman, S.; Jagannath, H.V.; Gowda, K.; Singh, D.K.; Rao, C.D. (2002). Prevalence of, and antigenic variation in, serotype G10 rotaviruses and detection of serotype G3 strains in diarrheic calves: implications for the origin of G10P11 or P11 type reassortant asymptomatic strains in newborn children in India. *Arch. Virol.* 147(1), 143-165.
- Vega, C.; Bok, M.; Chacana, P.; Saif, L.; Fernández, F.; Parreño, V. (2011). Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142, 156-169.
- Vilte, D.A.; Rabinovitz, B.C.; Mercado, E.C. (2012). Atypical virulence factors in Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sick calves. VTEC 2012: 8th international symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections. Amsterdam, The Netherlands. *Zoonoses Public Health* 59 (Suppl. 1), 52.
- Volotao, E.M.; Soares, C.C.; Maranhao, A.G.; Rocha, L.N.; Hoshino, Y.; Santos, N. (2006). Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000–2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J. Med. Virol.* 78, 263–272.

- Vu-Khac, H.; Holoda, E.; Pilipcinec, E.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Dahbi, G.; López, C.; González, E.A.; Blanco, J. (2006). Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. *BMC Vet. Res.* 2:1-10.
- Wales, A.D.; Woodward, M.J.; Pearson, G.R. (2005). Attaching-effacing bacteria in animals. *J. Comp. Pathol.* 132, 1-26.
- Wani, S.A.; Bhat, M.A.; Samanta, I.; Buchh, A.S.; Nishikawa, Y. (2004). *Escherichia coli* O16 associated with an outbreak of calf diarrhoea. *Vet. Rec.* 154, 506-507.
- Wani, S.A.; Bhat, M.A.; Samanta, I.; Nishikawa, Y.; Buchh, A.S. (2005). *Escherichia coli* O4:NM associated with an outbreak of calf diarrhoea. *Vet. J.* 169, 300-302.
- Wani, S.A.; Hussain, I.; Nabi, A.; Fayaz, I.; Nishikawa, Y. (2007). Variants of *eae* and *stx* genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from calves. *Let. Appl. Microbiol.* 45, 610-615.
- Ward, R.L.; Jiang, X.; Farkas, T.; Bass, D.M. (2006). Virology of the Gastrointestinal Tract, pp 55-98. In: S.K. Tying. *Mucosal Immunology and Virology*. Springer, London, UK.
- Wells, S.J.; Garber, L.P.; Hill, G.W. (1996). Health status of preweaned dairy heifers in the United States. *Prev. Vet. Med.* 29, 185-199.
- Welch, R.A. (2006). The genus *Escherichia*, pp 60-71. In: *The prokaryotes*. Springer, NY, US.
- Wieler, L. H.; Bauerfeind, R.; Baljer, G. (1992). Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zbl. Bakt.*, 276, 243-253.
- Wieler, L.H.; Sobjinski, G.; Schlapp, T.; Failing, K.; Weiss, R.; Menge, C.; Baljer, G. (2007). Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 11, 296-306.
- Wittum, T.E.; Salman, M.D.; King, M.E.; Mortimer, R.G.; Odde, K.G.; Morris, D.L. (1994). The influence of neonatal health on weaning weight of Colorado, USA beef calves. *Prev. Vet. Med.* 19, 15-25.
- Woode, G.N. (1978). Epizootiology of bovine rotavirus infection. *Vet. Rec.* 103, 44-46.
- Wu, G.; Mafura, M.; Carter, B.; Lynch, K.; Anjum, M.F.; Woodward, M.J.; Pritchard, G.C. (2010). Genes associated with *Escherichia coli* isolates from calves with diarrhoea and/or septicaemia. *Vet. Rec.* 166, 691-692.
- Yamamoto, S.; Terai, A.; Yuri, K.; Kurazono, H.; Takeda, Y.; Yoshida O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12: 85-90.
- Younis, E.E.; Ahmed, A.M.; El-Khodery, S.A.; Osman, S.A.; El-Naker, Y.F. (2009). Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt. *Res. Vet. Sci.* 87, 373-379.

Zarzoso, R.J.; Margueritte J.A. (1999). Evaluación de una estrategia vacunal para prevenir el síndrome diarreico en terneros neonatales. *Vet. Arg.* 16, 672-676.

Zoaratti de Verona, A.; Casaro, A.; Lombardi, G. (1979). Coronavirus en diarrea neonatal de los terneros. *Rev. Med. Vet.* 60, 294-295.

Zoratti de Verona, A.; Terzolo, H.R.; Casaro, A.P. (1980). Estudio etiológico preliminar de la diarrea neonatal de los terneros en la República Argentina. *Rev. Med. Vet.* 61, 467-474.

Apéndice 1

Análisis estadístico para comparar las frecuencias de detección de RVA en terneros según el sistema de producción y la condición clínica

1. Análisis bivariado: sistema productivo / infección por RVA

Tablas de contingencia

		Notas
Resultados creados		12-DEC-2013 20:57:00
Comentarios		
	Datos	C:\Users\Catalina\Documents\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav
	Conjunto de datos activo	DataSet0
Entrada	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Dividir archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	422
	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
Tratamiento de los valores perdidos	Casos utilizados	Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
		CROSSTABS /TABLES=Sistema Productivo BY RVA
		/FORMAT=AVALUE TABLES
Sintaxis		/STATISTICS=CHISQ RISK
		/CELLS=COUNT EXPECTED
		/COUNT ROUND CELL
		/BARChart.
	Tiempo de procesador	00:00:00,41
	Tiempo transcurrido	00:00:00,51
Recursos	Dimensiones solicitadas	2
	Casillas disponibles	174762

[DataSet0]C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav

Aclaración: las variables del análisis incluyen a los terneros que mostraron co-infección con coronavirus.

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Sistema Productivo * Rotavirus	422	100,0%	0	0,0%	422	100,0%

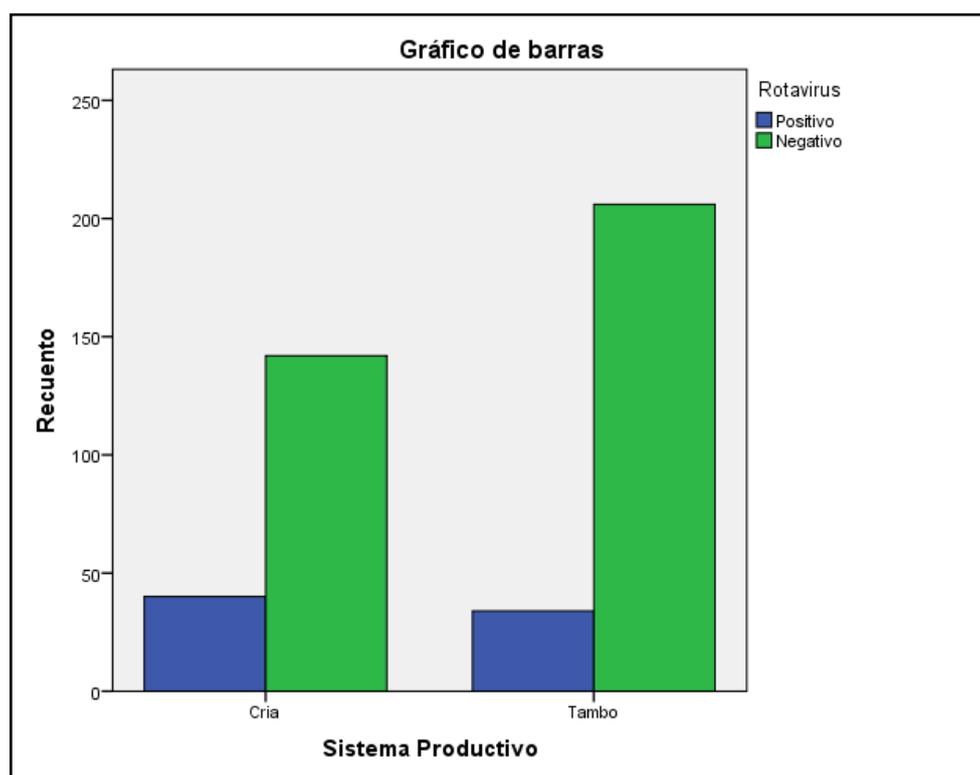
Tabla de contingencia Sistema Productivo * Rotavirus					
			Rotavirus		Total
			Positivo	Negativo	
Sistema Productivo	Cría	Frec. Observada	40	142	182
		Frec. esperada	31,9	150,1	182,0
	Tambo	Frec. Observada	34	206	240
		Frec. esperada	42,1	197,9	240,0
Total		Frec. Observada	74	348	422
		Frec. esperada	74,0	348,0	422,0

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral) P Valor	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,368 ^a	1	,037		
Corrección por continuidad ^b	3,844	1	,050		
Razón de verosimilitudes	4,328	1	,038		
Estadístico exacto de Fisher				,039	,025
Asociación lineal por lineal	4,357	1	,037		
N de casos válidos	422				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 31,91.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Estimación de riesgo			
	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
(OR) Razón de las ventajas para Sistema Productivo (Cría / Tambo)	1,707	1,030	2,827
Para la cohorte Rotavirus = Positivo	1,551	1,025	2,348
Para la cohorte Rotavirus = Negativo	,909	,829	,997
N de casos válidos	422		



2. Análisis bivariado: condición clínica / infección simple por RVA

Tablas de contingencia

		Notas
Resultados creados		12-DEC-2013 21:12:36
Comentarios		
	Datos	C:\Users\Catalina\Documents\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav
	Conjunto de datos activo	DataSet0
Entrada	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Dividir archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	422
	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
Tratamiento de los valores perdidos		Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
	Casos utilizados	CROSSTABS /TABLES= Condición Clínica BY RVA sin co-infección /FORMAT=AVALUE TABLES /STATISTICS=CHISQ RISK /CELLS=COUNT EXPECTED /COUNT ROUND CELL /BARChart.
Sintaxis		
	Tiempo de procesador	00:00:00,44
	Tiempo transcurrido	00:00:00,50
Recursos	Dimensiones solicitadas	2
	Casillas disponibles	174762

[DataSet0] C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav

Aclaración: las variables del análisis no incluyen a los terneros que mostraron co-infección con coronavirus.

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Condición Clínica * Rotavirus	419	99,3%	3	0,7%	422	100,0%

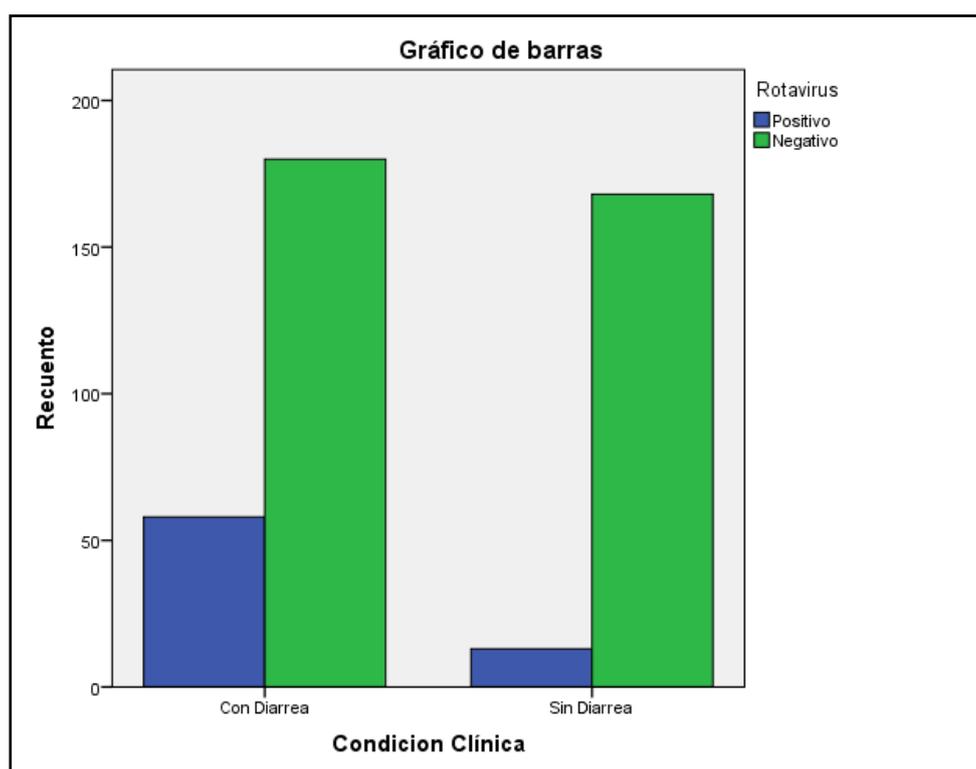
Tabla de contingencia Condicion Clínica * Rotavirus					
			Rotavirus		Total
			Positivo	Negativo	
Condición Clínica	Con Diarrea	Frec. observada	58	180	z
		Frec. esperada	40,3	197,7	238,0
	Sin Diarrea	Frec. observada	13	168	181
		Frec. esperada	30,7	150,3	181,0
Total		Frec. observada	71	348	419
		Frecuencia esperada	71,0	348,0	419,0

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	21,580 ^a	1	,000		
Corrección por continuidad ^b	20,376	1	,000		
Razón de verosimilitudes	23,462	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	21,529	1	,000		
N de casos válidos	419				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 30,67.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Estimación de riesgo			
	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
(OR) Razón de las ventajas para Condición Clínica (Con Diarrea / Sin Diarrea)	4,164	2,202	7,875
Para la cohorte Rotavirus = Positivo	3,393	1,920	5,997
Para la cohorte Rotavirus = Negativo	,815	,750	,885
N de casos válidos	419		



3. Prueba de Mantel Haenszel en tablas estratificadas para evaluar factor de confusión.
Sistema productivo / condición clínica / RVA

Tablas de contingencia

Notas	
Resultados creados	12-DEC-2013 21:13:52
Comentarios	
	C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav
	DataSet0
Entrada	<ninguno>
	<ninguno>
	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo 422
	Definición de los perdidos Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
Tratamiento de los valores perdidos	Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
	Casos utilizados
	CROSSTABS /TABLES=Condición Clínica BY RVA sin co-infección BY Sistema Productivo /FORMAT=AVALUE TABLES /STATISTICS=CHISQ CORR RISK CMH(1) /CELLS=COUNT EXPECTED /COUNT ROUND CELL /BARChart.
Sintaxis	
	Tiempo de procesador 00:00:00,81
	Tiempo transcurrido 00:00:00,88
Recursos	Dimensiones solicitadas 3
	Casillas disponibles 142987

[DataSet0] C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RAV\Análisis final.sav

Aclaración: las variables del análisis no incluyen a los terneros que mostraron co-infección con coronavirus.

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Condición Clínica * Rotavirus * Sistema Productivo	419	99,3%	3	0,7%	422	100,0%

Tabla de contingencia Condición Clínica * Rotavirus * Sistema Productivo						
Sistema Productivo			Rotavirus		Total	
			Positivo	Negativo		
Cría	Condición Clínica	Con Diarrea	Recuento	32	72	104
		Frecuencia esperada	22,9	81,1	104,0	
	Sin Diarrea	Recuento	8	70	78	
		Frecuencia esperada	17,1	60,9	78,0	
	Total	Recuento	40	142	182	
		Frecuencia esperada	40,0	142,0	182,0	
Tambo	Condición Clínica	Con Diarrea	Recuento	26	108	134
		Frecuencia esperada	17,5	116,5	134,0	
	Sin Diarrea	Recuento	5	98	103	
		Frecuencia esperada	13,5	89,5	103,0	
	Total	Recuento	31	206	237	
		Frecuencia esperada	31,0	206,0	237,0	
Total	Condición Clínica	Con Diarrea	Recuento	58	180	238
		Frecuencia esperada	40,3	197,7	238,0	
	Sin Diarrea	Recuento	13	168	181	
		Frecuencia esperada	30,7	150,3	181,0	
	Total	Recuento	71	348	419	
		Frecuencia esperada	71,0	348,0	419,0	

Pruebas de chi-cuadrado						
Sistema Productivo	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)		
Cría	Chi-cuadrado de Pearson	10,937 ^c	1	,001		
	Corrección por continuidad ^b	9,774	1	,002		
	Razón de verosimilitudes	11,721	1	,001		
	Estadístico exacto de Fisher					,001
	Asociación lineal por lineal	10,877	1	,001		
	N de casos válidos	182				
Tambo	Chi-cuadrado de Pearson	10,842 ^d	1	,001		
	Corrección por continuidad ^b	9,600	1	,002		
	Razón de verosimilitudes	12,002	1	,001		
	Estadístico exacto de Fisher					,001
	Asociación lineal por lineal	10,796	1	,001		
	N de casos válidos	237				
Total	Chi-cuadrado de Pearson	21,580 ^a	1	,000		
	Corrección por continuidad ^b	20,376	1	,000		
	Razón de verosimilitudes	23,462	1	,000		
	Estadístico exacto de Fisher					,000
	Asociación lineal por lineal	21,529	1	,000		
	N de casos válidos	419				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 30,67.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 17,14.

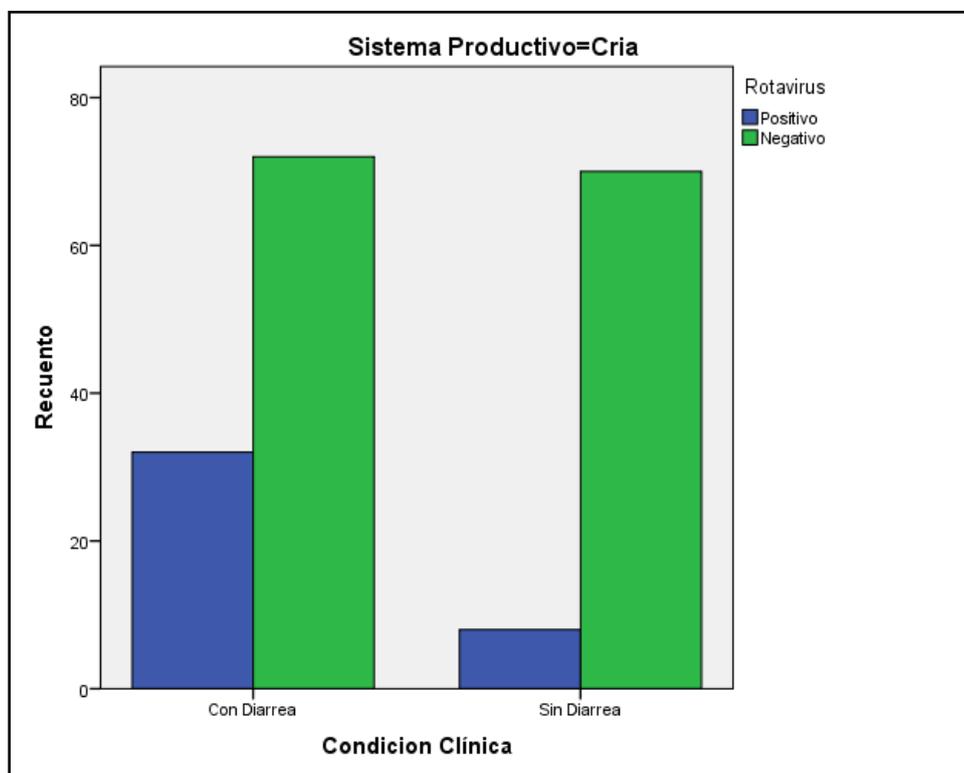
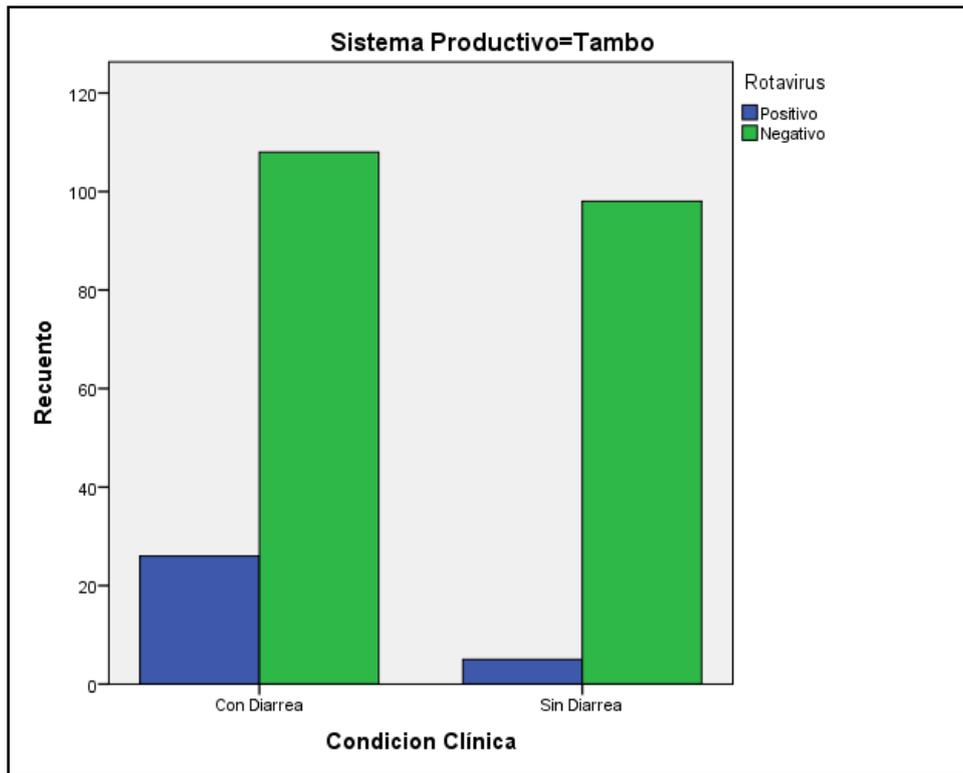
d. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 13,47.

Pruebas de chi-cuadrado		
Sistema Productivo		Sig. exacta (unilateral)
Cría	Chi-cuadrado de Pearson	
	Corrección por continuidad ^b	
	Razón de verosimilitudes	
	Estadístico exacto de Fisher	,001
	Asociación lineal por lineal	
Tambo	N de casos válidos	
	Chi-cuadrado de Pearson	
	Corrección por continuidad ^b	
	Razón de verosimilitudes	
	Estadístico exacto de Fisher	,001
Total	Asociación lineal por lineal	
	N de casos válidos	
	Chi-cuadrado de Pearson	
	Corrección por continuidad ^b	
	Razón de verosimilitudes	
	Estadístico exacto de Fisher	,000
	Asociación lineal por lineal	
	N de casos válidos	

Medidas simétricas					
Sistema Productivo			Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b
	Intervalo por intervalo	R de Pearson	,245	,064	3,392
Cría	Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,245	,064	3,392
	N de casos válidos		182		
	Intervalo por intervalo	R de Pearson	,214	,053	3,356
Tambo	Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,214	,053	3,356
	N de casos válidos		237		
	Intervalo por intervalo	R de Pearson	,227	,041	4,759
Total	Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,227	,041	4,759
	N de casos válidos		419		
<p>a. Asumiendo la hipótesis alternativa.</p> <p>b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.</p> <p>c. Basada en la aproximación normal.</p>					

Medidas simétricas			
Sistema Productivo			Sig. aproximada
	Intervalo por intervalo	R de Pearson	,001
Cría	Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,001
	N de casos válidos		
	Intervalo por intervalo	R de Pearson	,001
Tambo	Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,001
	N de casos válidos		
	Intervalo por intervalo	R de Pearson	,000
Total	Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,000
	N de casos válidos		

Estimación de riesgo				
Sistema Productivo		Valor	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Cría	Razón de las ventajas para Condición Clínica (Con Diarrea / Sin Diarrea)	3,889	1,676	9,023
	Para la cohorte Rotavirus = Positivo	3,000	1,465	6,145
	Para la cohorte Rotavirus = Negativo	,771	,665	,895
	N de casos válidos	182		
Tambo	Razón de las ventajas para Condición Clínica (Con Diarrea / Sin Diarrea)	4,719	1,744	12,767
	Para la cohorte Rotavirus = Positivo	3,997	1,590	10,050
	Para la cohorte Rotavirus = Negativo	,847	,771	,930
	N de casos válidos	237		
Total	Razón de las ventajas para Condición Clínica (Con Diarrea / Sin Diarrea)	4,164	2,202	7,875
	Para la cohorte Rotavirus = Positivo	3,393	1,920	5,997
	Para la cohorte Rotavirus = Negativo	,815	,750	,885
	N de casos válidos	419		



Pruebas de homogeneidad de la razón de las ventajas			
	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Breslow-Day	,085	1	,771
De Tarone	,085	1	,771

Pruebas de independencia condicional			
	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintótica (bilateral)
De Cochran	21,754	1	,000
Mantel-Haenszel	20,436	1	,000

Bajo el supuesto de independencia condicional, el estadístico de Cochran se distribuye asintóticamente según una distribución de chi-cuadrado con 1 gl, sólo si el número de estratos es fijo, mientras que el estadístico de Mantel-Haenszel se distribuye siempre asintóticamente según una distribución de chi-cuadrado con 1 gl. Tenga presente que se suprime la corrección por continuidad del estadístico de Mantel-Haenszel cuando la suma de las diferencias entre lo observado y lo esperado es igual a 0.

Estimación de la razón de las ventajas común de Mantel-Haenszel			
Estimación			4,236
ln(estimación)			1,444
Error típ. de ln(estimación)			,328
Sig. asintótica (bilateral)			,000
Intervalo de confianza asintótico al 95%	Razón de ventajas común	Límite inferior	2,229
		Límite superior	8,052
	ln(Razón de ventajas común)	Límite inferior	,801
		Límite superior	2,086

La estimación de la razón de las ventajas común de Mantel-Haenszel se distribuye de manera asintóticamente normal bajo el supuesto de razón de las ventajas común igual a 1,000. Lo mismo ocurre con el log natural de la estimación.

4. Análisis bivariado: sistema productivo / RVA en terneros con diarrea

Tablas de contingencia

Notas		
Resultados creados		12-DEC-2013 21:47:21
Comentarios		
	Datos	C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav
	Conjunto de datos activo	DataSet0
Entrada	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Dividir archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	422
	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
Tratamiento de los valores perdidos		Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
	Casos utilizados	
		CROSSTABS
		/TABLES=solo diarrea BY RVA sin co-infección
		/FORMAT=AVALUE TABLES
		/STATISTICS=CHISQ RISK
		/CELLS=COUNT EXPECTED
		/COUNT ROUND CELL
		/BARChart.
	Tiempo de procesador	00:00:00,36
	Tiempo transcurrido	00:00:00,51
Recursos	Dimensiones solicitadas	2
	Casillas disponibles	174762

[DataSet0] C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav

Aclaración: las variables del análisis no incluyen a los terneros que mostraron co-infección con coronavirus.

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Sistema Productivo solo diarrea * Rotavirus	238	56,4%	184	43,6%	422	100,0%

Tabla de contingencia Sistema Productivo solo diarrea * Rotavirus					
			Rotavirus		Total
			Positivo	Negativo	
Sistema Productivo solo diarrea	Cría	Recuento	32	72	104
		Frecuencia esperada	25,3	78,7	104,0
	Tambo	Recuento	26	108	134
		Frecuencia esperada	32,7	101,3	134,0
Total		Recuento	58	180	238
		Frecuencia esperada	58,0	180,0	238,0

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,104 ^a	1	,043		
Corrección por continuidad ^b	3,511	1	,061		
Razón de verosimilitudes	4,079	1	,043		
Estadístico exacto de Fisher				,049	,031
Asociación lineal por lineal	4,087	1	,043		
N de casos válidos	238				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 25,34.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Estimación de riesgo			
	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para Sistema Productivo solo diarrea (Cria / Tambo)	1,846	1,016	3,355
Para la cohorte Rotavirus = Positivo	1,586	1,011	2,486
Para la cohorte Rotavirus = Negativo	,859	,737	1,001
N de casos válidos	238		



5. Regresión logística incluyendo sistema productivo y condición clínica (p valor > 0,05 en el análisis bivariado)

Regresión logística

Notas		
Resultados creados		13-DEC-2013 10:09:39
Comentarios		
	Datos	C:\Users\Catalina\Documents\EPIDEMIOL OGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav
	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1
Entrada	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Dividir archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	422
Tratamiento de los datos perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se consideran como perdidos LOGISTIC REGRESSION VARIABLES RVA1 /METHOD=ENTER Sistema Productivo Condición Clínica /CONTRAST (Sistema Productivo)=Indicator /CONTRAST (Condición Clínica)=Indicator /PRINT=GOODFIT CI(95) /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
Sintaxis		
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00,03
	Tiempo transcurrido	00:00:00,03

[Conjunto_de_datos1]
C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav

Aclaración: las variables del análisis no incluyen a los terneros que mostraron co-infección con coronavirus.

Resumen del procesamiento de los casos		
Casos no ponderados ^a	N	Porcentaje
Incluidos en el análisis	422	100,0
Casos seleccionados		
Casos perdidos	0	,0
Total	422	100,0
Casos no seleccionados	0	,0
Total	422	100,0

a. Si está activada la ponderación, consulte la tabla de clasificación para ver el número total de casos.

Codificación de la variable dependiente	
Valor original	Valor interno
Negativo	0
Positivo	1

Codificaciones de variables categóricas			
		Frecuencia	Codificación de parámetros
			(1)
Condición Clínica	Con Diarrea	241	1,000
	Sin Diarrea	181	,000
Sistema Productivo	Cría	182	1,000
	Tambo	240	,000

Bloque 0: Bloque inicial

Tabla de clasificación ^{a,b}					
	Observado	Pronosticado			
		Rotavirus		Porcentaje correcto	
		Negativo	Positivo		
Paso 0	Rotavirus	Negativo	348	0	100,0
		Positivo	74	0	,0
	Porcentaje global				

a. En el modelo se incluye una constante.
b. El valor de corte es ,500

Variables en la ecuación						
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 0 Constante	-1,548	,128	146,257	1	,000	,213

Variables que no están en la ecuación					
			Puntuación	gl	Sig.
Paso 0	Variables	Sistema Productivo(1)	4,368	1	,037
		Condición Clínica(1)	23,493	1	,000
	Estadísticos globales		27,849	2	,000

Bloque 1: Método = Introducir

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo				
		Chi cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Paso	30,229	2	,000
	Bloque	30,229	2	,000
	Modelo	30,229	2	,000

Resumen del modelo			
Paso	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	361,621 ^a	,069	,114

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 5 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

Prueba de Hosmer y Lemeshow			
Paso	Chi cuadrado	gl	Sig.
1	,210	2	,901

Tabla de contingencias para la prueba de Hosmer y Lemeshow						
		Rotavirus = Negativo		Rotavirus = Positivo		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso 1	1	98	97,299	5	5,701	103
	2	70	70,701	8	7,299	78
	3	108	108,701	29	28,299	137
	4	72	71,299	32	32,701	104

Tabla de clasificación					
	Observado	Pronosticado			
		Rotavirus		Porcentaje correcto	
		Negativo	Positivo		
Paso 1	Rotavirus	Negativo	348	0	100,0
		Positivo	74	0	,0
	Porcentaje global				82,5

a. El valor de corte es ,500

Variables en la ecuación									
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)		
							Inferior	Superior	
							Paso 1 ^a	Sistema Productivo(1)	,566
	CondiciónClínica(1)	1,491	,325	21,021	1	,000	4,443	2,349	8,405
	Constante	-2,837	,324	76,847	1	,000	,059		o

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Sistema Productivo, Condición Clínica.

6. Análisis bivariado: sistema productivo / condición clínica

Tablas de contingencia de sistema productivo y condición clínica

Notas		
Resultados creados		13-DEC-2013 00:29:02
Comentarios		
	Datos	C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav
	Conjunto de datos activo	DataSet0
Entrada	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Dividir archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	422
	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
Tratamiento de los valores perdidos		Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
	Casos utilizados	CROSSTABS /TABLES=Sistema Productivo BY Condición Clínica /FORMAT=AVALUE TABLES /STATISTICS=CHISQ RISK /CELLS=COUNT EXPECTED BPROP /COUNT ROUND CELL /BARChart.
Sintaxis		
	Tiempo de procesador	00:00:00,39
	Tiempo transcurrido	00:00:00,45
Recursos	Dimensiones solicitadas	2
	Casillas disponibles	174762

[DataSet0] C:\Users\Catalina\Documents\MAESTRIA\EPIDEMIOLOGIA\PROYECTO RVA\Análisis final.sav

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Sistema Productivo * Condicion Clínica	422	100,0%	0	0,0%	422	100,0%

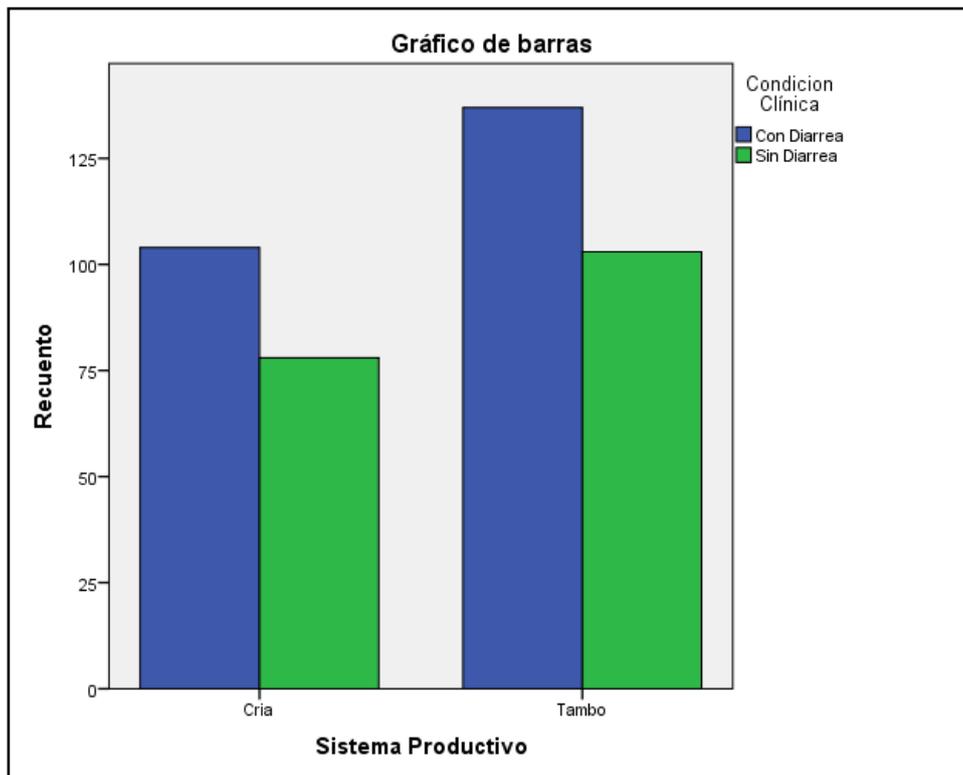
Tabla de contingencia Sistema Productivo * Condicion Clínica					
			Condición Clínica		Total
			Con Diarrea	Sin Diarrea	
Sistema Productivo	Cría	Recuento	104 _a	78 _a	182
		Frecuencia esperada	103,9	78,1	182,0
	Tambo	Recuento	137 _a	103 _a	240
		Frecuencia esperada	137,1	102,9	240,0
Total		Recuento	241	181	422
		Frecuencia esperada	241,0	181,0	422,0

Cada letra de subíndice indica un subconjunto de Condicion Clínica categorías cuyas proporciones de columna no difieren significativamente entre sí en el nivel ,05.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,000 ^a	1	,990		
Corrección por continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitudes	,000	1	,990		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,535
Asociación lineal por lineal	,000	1	,990		
N de casos válidos	422				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 78,06.
b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Estimación de riesgo			
	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para Sistema Productivo (Cría / Tambo)	1,002	,679	1,479
Para la cohorte Condicion Clínica = Con Diarrea	1,001	,847	1,183
Para la cohorte Condicion Clínica = Sin Diarrea	,999	,800	1,247
N de casos válidos	422		



Apéndice 1

**Análisis filogenético de cepas de RVA que circulan en campos
de cría y tambos de la provincia de Buenos Aires**

Fig. 23.2. Análisis filogenético del ORF de VP7 para el genotipo G6. El árbol de secuencias nucleotídicas fue creado con el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los corchetes negros indican linajes, los cuales están representados con números romanos. Cepas de referencia WC3, NCDV e IND en negrita. Los marcos incluyen las cepas argentinas con sus respectivos nombres, tipos de explotación, provincias y años de recolección. Símbolos: cuencas lecheras “Oeste” (●), “Abasto Norte” (■) y “Mar y Sierras” (▲); zonas de cría “Depresión de Laprida” (□) y “Cuenca del Salado” (○). Los recuadros en gris indican la agrupación de las cepas G6(IV) según su origen en las zonas de cría bovina. El marco rojo señala una cepa G6(IV) de tambo distanciada genéticamente del resto de las cepas Argentinas. Abreviaturas: D (tambo), B (cria), BA (Buenos Aires), Co (Córdoba), ER (Entre Ríos), LP (La Pampa), RN (Río Negro) y SF (Santa Fé).

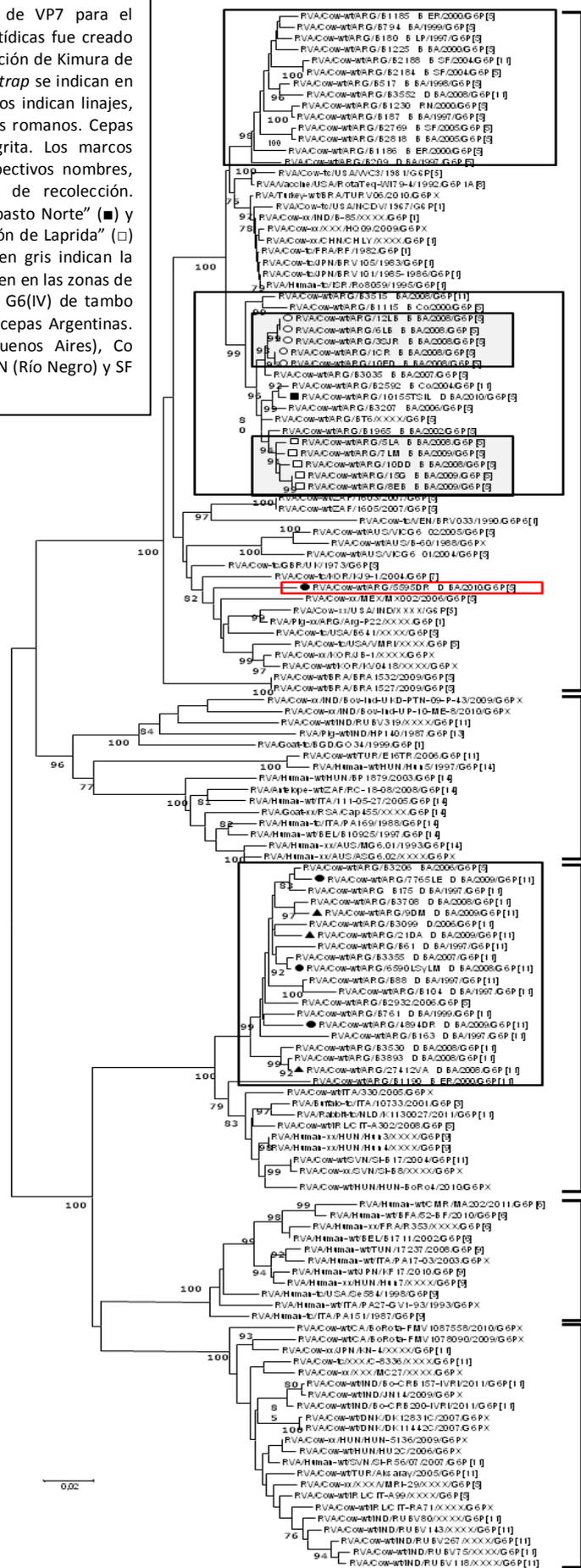


Fig. 24.2. Análisis filogenético del ORF de VP7 para el genotipo G10. El árbol de secuencias nucleotídicas fue creado con el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los corchetes negros indican linajes, los cuales están representados con números romanos. Cepa de referencia B223 en negrita. El marco incluye las cepas argentinas con sus respectivos nombres, tipos de explotación, provincias y años de recolección. Símbolos: cuencas lecheras "Oeste" (●) y "Mar y Sierras" (▲). Abreviaturas: D (tambo), B (cría), BA (Buenos Aires), SL (San Luis) y Ne (Neuquén).

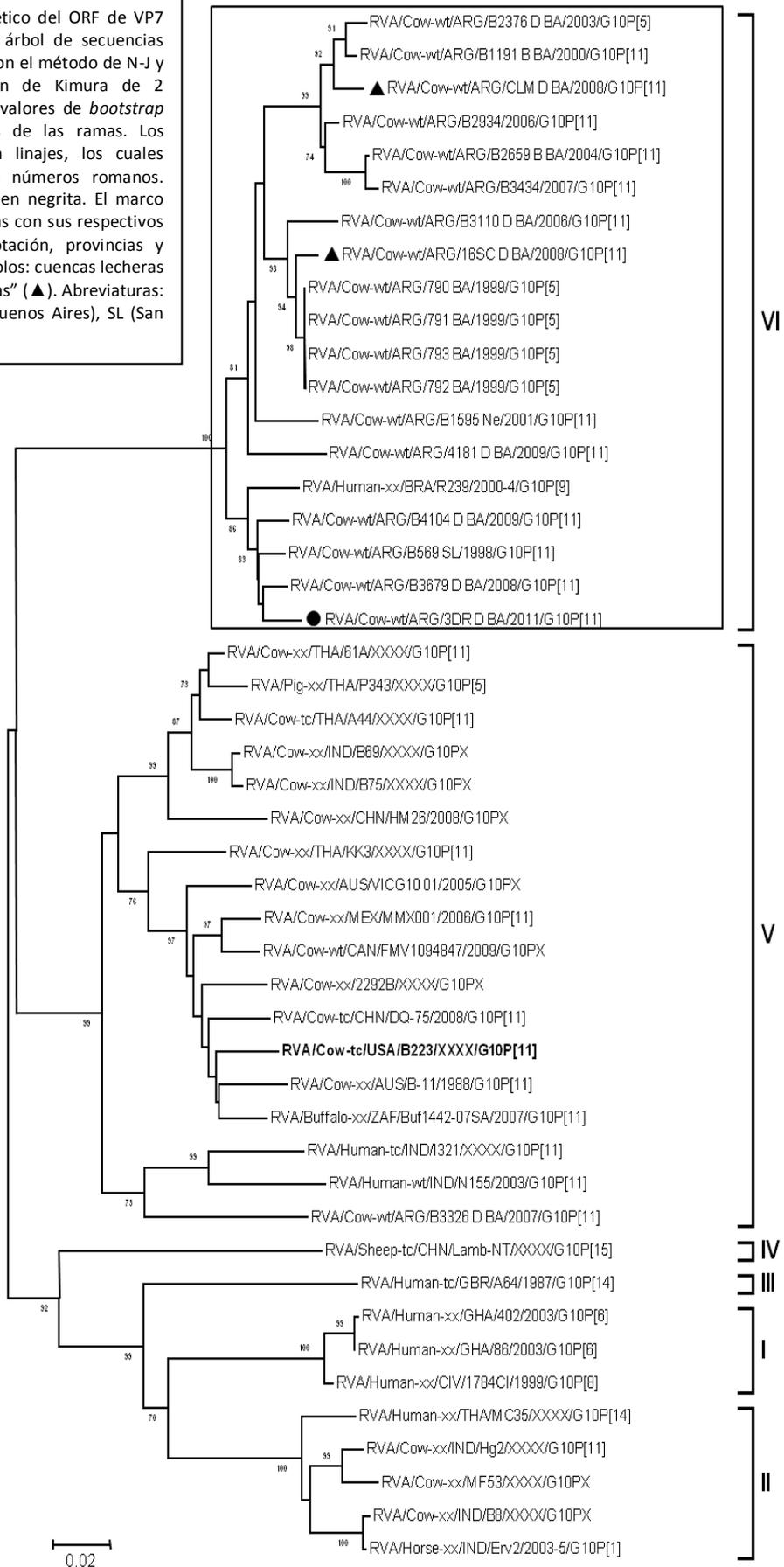


Fig. 25.2. Análisis filogenético de VP8* para el genotipo P[5]. El árbol de secuencias nucleotídicas fue creado con el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los corchetes negros indican linajes, los cuales están representados con números romanos. Cepas de referencia UK y WC3 en negrita. Los marcos señalan las cepas argentinas con sus respectivos nombres, tipos de explotación, provincias y años de recolección. Símbolos: cuencas lecheras "Oeste" (●) y "Abasto Norte" (■); zonas de cría "Depresión de Laprida" (□) y "Cuenca del Salado" (○). Los recuadros en gris indican los agrupamientos de las cepas según su origen en las zonas de cría bovina. Abreviaturas: D (tambo), B (cría), BA (Buenos Aires), ER (Entre Ríos), Co (Córdoba), LP (La Pampa) y SF (Santa Fe).

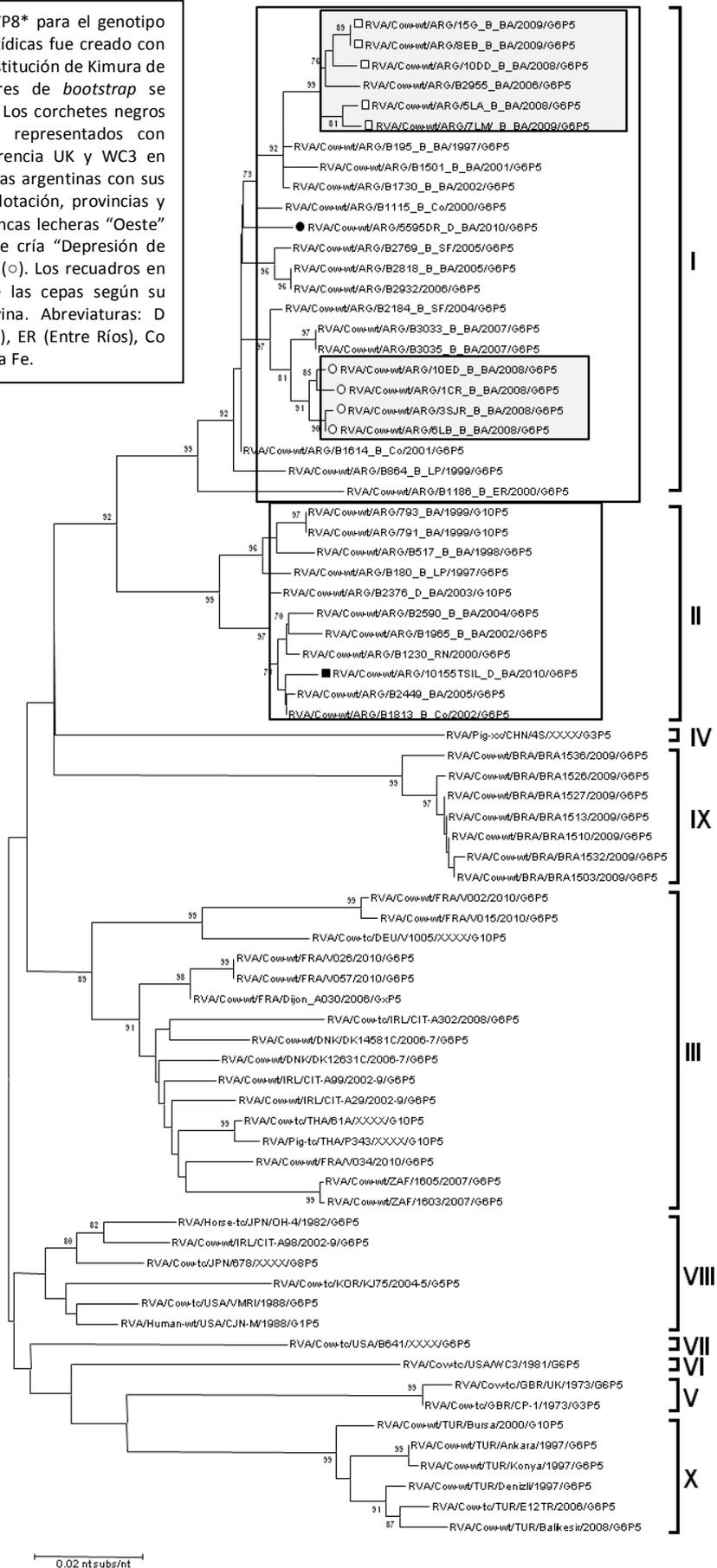


Fig. 26.2. Análisis filogenético de VP8* para el genotipo P[11]. El árbol está basado en secuencias de nucleótidos y se construyó por el método de N-J con el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los corchetes negros indican linajes, los cuales están representados por números romanos. Cepa de referencia B223 en negrita. Los recuadros grises incluyen las cepas argentinas con su nombre, tipo de explotación, provincia y año de recolección. Símbolos: cuencas lecheras "Mar y Sierras" (▲), "Oeste" (●) y zona de cría "Depresión de Laprida" (□). En recuadro rojo y negrita se indica la cepa G8P[11] bovina. Abreviaturas: D (tambo), B (cría), BA (Buenos Aires), ER (Entre Ríos), Co (Córdoba) y Ne (Neuquén).

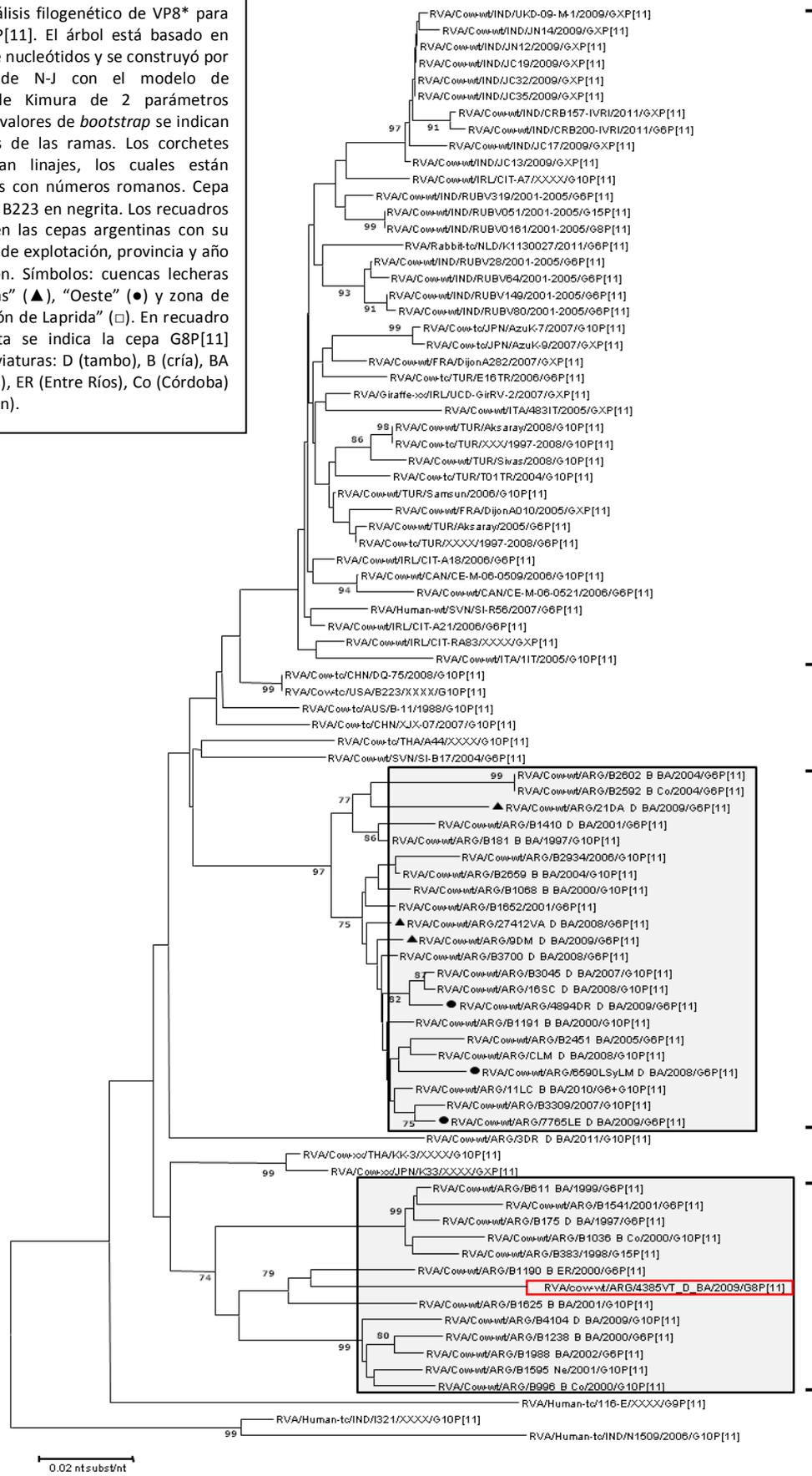


Fig. 27.2. Análisis filogenético de VP8* genotipo P[11]. El árbol está basado en secuencias de aminoácidos y se construyó por el método de N-J con el modelo de sustitución de Poisson (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los corchetes negros indican linajes, los cuales están representados con números romanos. Cepa de referencia B223 en negrita. Los recuadros grises incluyen las cepas argentinas con su nombre, tipo de explotación, provincia y año de recolección. Símbolos: cuencas lecheras “Mar y Sierras” (▲), “Oeste” (●) y zona de cría “Depresión de Laprida” (□). En el recuadro rojo se indica la cepa G8P[11] bovina. Abreviaturas: D (tambo), B (cría), BA (Buenos Aires), ER (Entre Ríos), Co (Córdoba) y Ne (Neuquén).

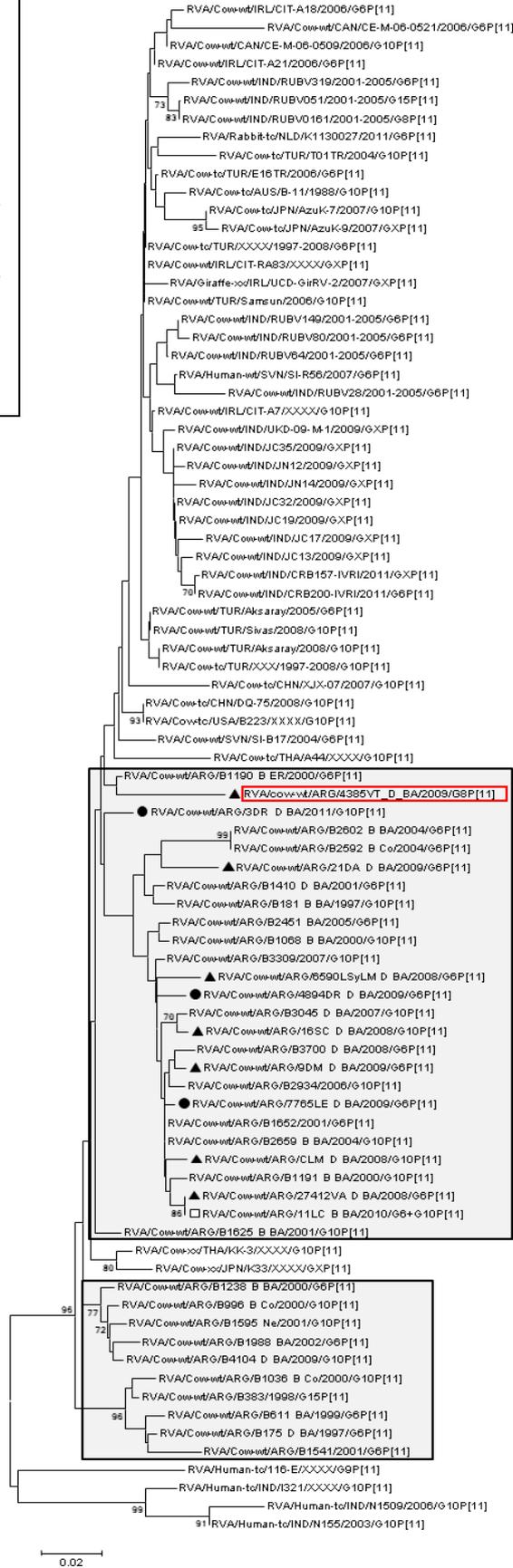


Fig. 28.2. Análisis filogenético del ORF de VP7 para el genotipo G8. El árbol de secuencias nucleotídicas fue reconstruido con el método de N-J y el modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros (Mega5). Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos de las ramas. Los corchetes negros indican linajes, los cuales están representados con números romanos. La cepa bovina 4385VT_D_BA (G8P[11]) se indica con un símbolo (▲) rojo, el cual representa la cuenca lechera "Mar y Sierras". El *subcluster* de cepas G8 de Argentina se identifica en azul.

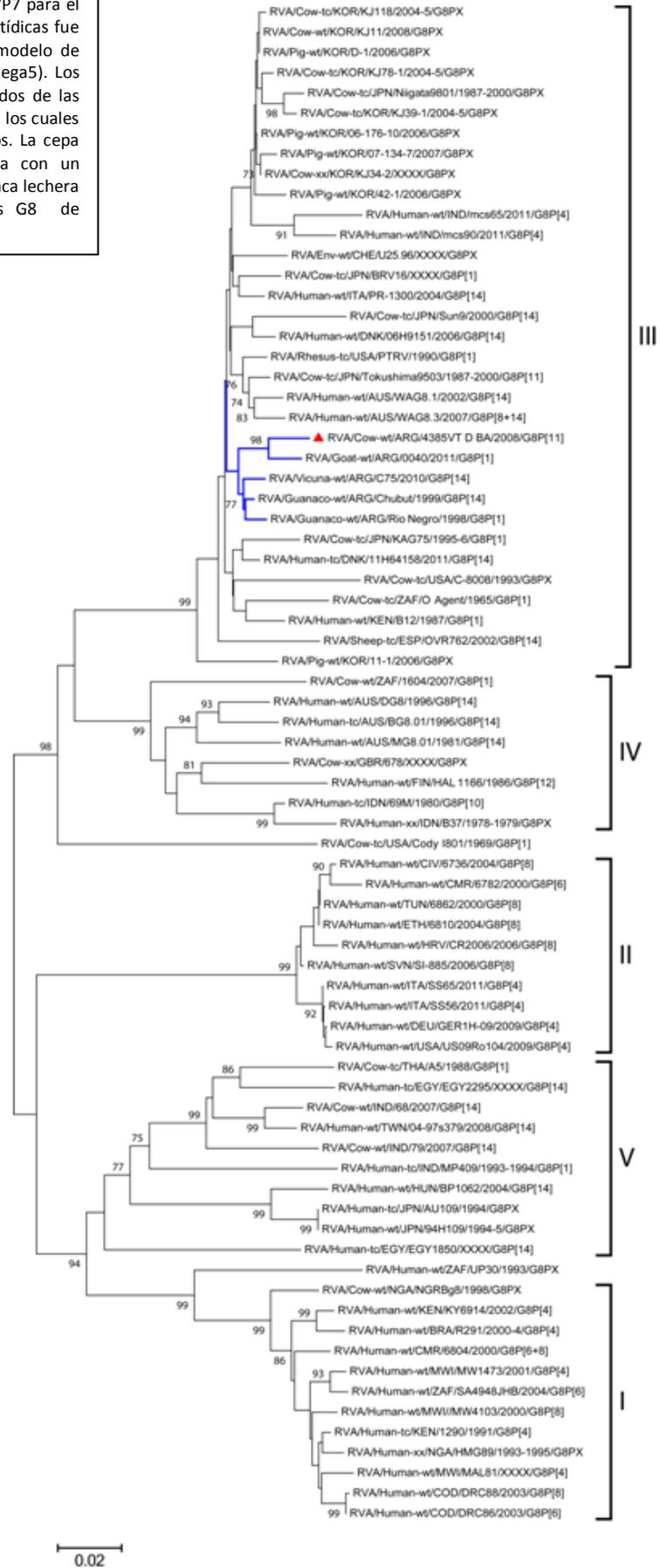


Fig. 2.2

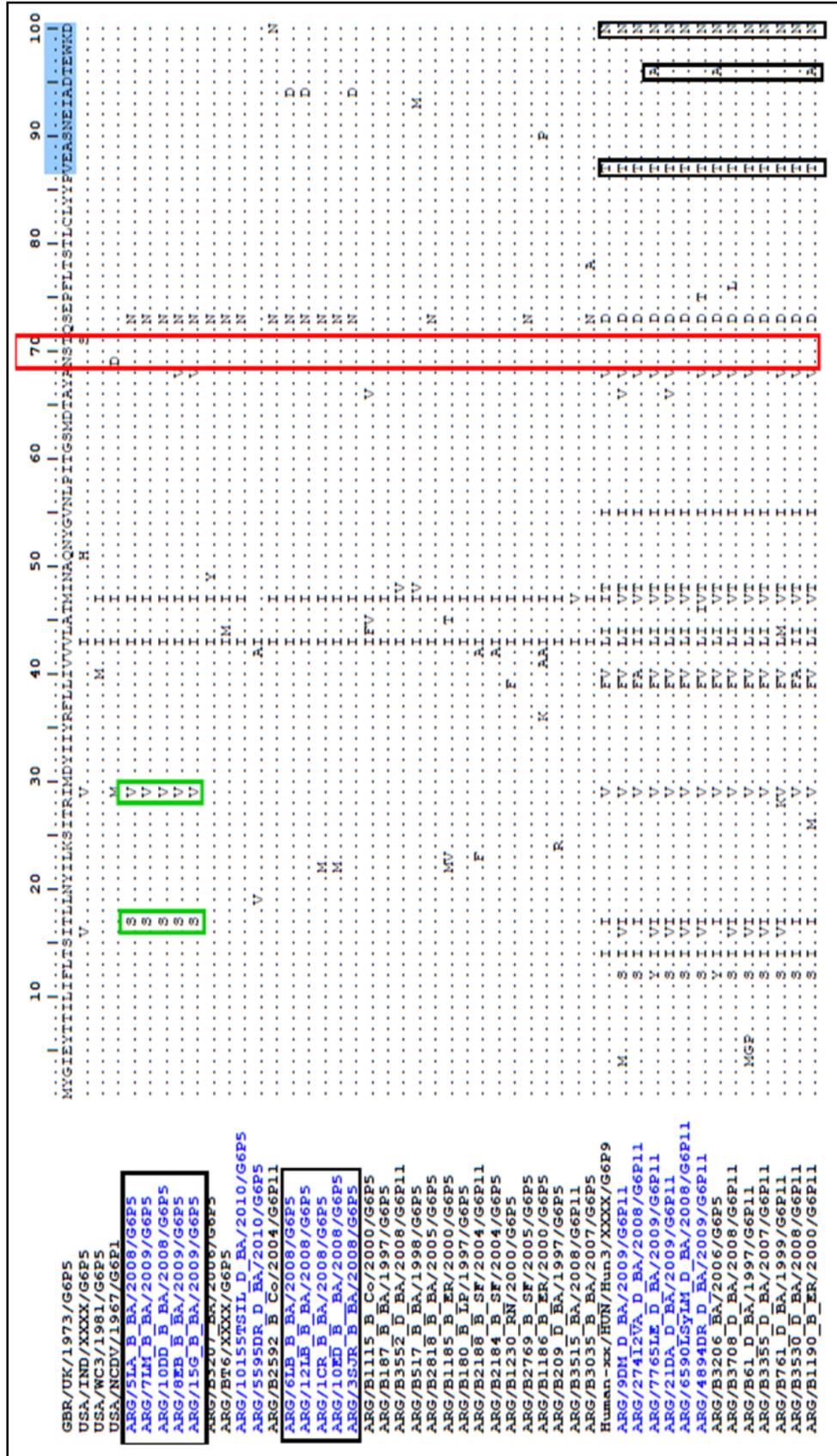


Fig. 31.2

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GBR/UK/1973/G6P5										
ARG/15C_B_BA/2009/G6P5										
ARG/8ER_B_BA/2009/G6P5										
ARG/DD10_B_BA/2008/G6P5										
ARG/5LA_B_BA/2008/G6P5										
ARG/7LM/B_BA/2009/G6P5										
ARG/TUED_B_BA/2008/G6P5										
ARG/1CR_B_BA/2008/G6P5										
ARG/3SJR_B_BA/2008/G6P5										
ARG/6LB_B_BA/2008/G6P5										
ARG/5595DR_D_BA/2010/G6P5										
ARG/10155TSL_D_BA/2010/G6P5										
ARG/B3033_B_BA/2007/G6P5										
ARG/B3035_B_BA/2007/G6P5										
ARG/B2184_B_SF/2004/G6P5										
ARG/B2327/2006/G6P5										
ARG/B2818_B_BA/2005/G6P5										
ARG/B2769_B_SF/2005/G6P5										
ARG/B1730_B_BA/2002/G6P5										
ARG/B1186_B_ER/2000/G6P5										
ARG/B864_B_LP/1999/G6P5										
ARG/B1501_B_BA/2001/G6P5										
ARG/B195_B_BA/1997/G6P5										
ARG/B1115_B_Co/2000/G6P5										
ARG/B1614_B_Co/2001/G6P5										
ARG/B1813_B_Co/2002/G6P5										
ARG/B1230_RN/2000/G6P5										
ARG/B2590_B_BA/2004/G6P5										
ARG/B1965_B_BA/2002/G6P5										
Horse-tc/JPN/OH-4/1982/G6P5										
IRL/CIT-A98/2002-9/G6P5										
JPN/678/XXXX/G8P5										
USA/VMRI/1988/G6P5										
KOR/KJ75/2004-5/G5P5										
USA/B641/XXXX/G6P5										
BRB/BRAI527/2003/G6P5										
BRB/BRAI513/2003/G6P5										
FRA/V002/2010/G6P5										
FRA/V015/2010/G6P5										
DEU/V1005/XXXX/G10P5										
FRA/V026/2010/G6P5										
FRA/V057/2010/G6P5										
THA/61A/XXXX/G10P5										
P1g-tc/THA/P343/XXXX/G10P5										
ZAF/1605/2007/G6P5										
ZAF/1603/2007/G6P5										
IRL/CIT-A99/2002-9/G6P5										
FRA/V034/2010/G6P5										
GBR/CP-1/1973/G3P5										
USA/WC3/1981/G6P5										
TUR/Bursa/2000/G10P5										
TUR/Ankara/1997/G6P5										
TUR/Konya/1997/G6P5										
TUR/E12TR/2006/G6P5										
TUR/Denizli/1997/G6P5										
TUR/Balikesir/2008/G6P5										
Human-wt/USA/CJN-M/1988/G1P5										
P1g-xx/CHN/4S/XXXX/G3P5										

Fig. 31.2

GBR/DK/1973/G6P5	210	220	230	240	250	260	270	280	290
ARG/15G_B_BA/2009/G6P5	
ARG/8EB_B_BA/2009/G6P5	
ARG/DD10_B_BA/2008/G6P5	
ARG/5LA_B_BA/2008/G6P5	
ARG/7IM7_B_BA/2009/G6P5	
ARG/10ED_B_BA/2008/G6P5	
ARG/1CR_B_BA/2008/G6P5	
ARG/3SJR_B_BA/2008/G6P5	
ARG/6LB_B_BA/2008/G6P5	
ARG/5595DR_D_BA/2010/G6P5	
ARG/10155TSIL_D_BA/2010/G6P5	
ARG/B3033_B_BA/2007/G6P5	
ARG/B3035_B_BA/2007/G6P5	
ARG/B2184_B_SF/2004/G6P5	
ARG/B2932/2006/G6P5	
ARG/B2818_B_BA/2005/G6P5	
ARG/B2769_B_SF/2005/G6P5	
ARG/B1730_B_BA/2002/G6P5	
ARG/B1186_B_ER/2000/G6P5	
ARG/B864_B_LP/1999/G6P5	
ARG/B1501_B_BA/2001/G6P5	
ARG/B195_B_BA/1997/G6P5	
ARG/B1115_B_Co/2000/G6P5	
ARG/B1614_B_Co/2001/G6P5	
ARG/B1813_B_Co/2002/G6P5	
ARG/B1230_RN/2000/G6P5	
ARG/B2590_B_BA/2004/G6P5	
ARG/B1965_B_BA/2002/G6P5	
Horse-tc/JPN/OH-4/1982/G6P5	
IRL/CIT-A98/2002-9/G6P5	
JPN/678/XXXX/G8P5	
USA/VMRI/1988/G6P5	
KOR/KJ75/2004-5/G5P5	
USA/B641/XXXX/G6P5	
BRB/BRA1527/2009/G6P5	
BRB/BRA1513/2009/G6P5	
FRA/V002/2010/G6P5	
FRA/V015/2010/G6P5	
DEU/V1005/XXXX/G10P5	
FRA/V026/2010/G6P5	
FRA/V057/2010/G6P5	
THA/61A/XXXX/G10P5	
Pig-tc/THA/P343/XXXX/G10P5	
ZAF/1605/2007/G6P5	
ZAF/1603/2007/G6P5	
IRL/CIT-A99/2002-9/G6P5	
FRA/V034/2010/G6P5	
GBR/CP-1/1973/G3P5	
USA/WC3/1981/G6P5	
TUR/Bursa/2000/G10P5	
TUR/Ankara/1997/G6P5	
TUR/Konya/1997/G6P5	
TUR/E12TR/2006/G6P5	
TUR/Denizli/1997/G6P5	
TUR/Balikesir/2008/G6P5	
Human-wt/USA/CJN-M/1988/G1P5	
Pig-xx/CHN/4S/XXXX/G3P5	

Fig. 31.2 Representación esquemática de las secuencias deducidas de aa de la subunidad VP8* para las cepas P[5]. En letras azules se indican las cepas argentinas que fueron caracterizadas en el presente estudio y los recuadros negros separan los subgrupos de cepas según la ubicación de los establecimientos de cría. Para aquellas cepas que tienen un origen diferente al bovino se especifica la especie hospedadora en el nombre. El guión indica coincidencia en el residuo de aa para cada posición con respecto a la cepa vacunal UK (G6P[5]). La cruz (x) indica finalización de la secuencia de aminoácidos. En rojo se representa la región antigénica 8-1 (residuos 100, 146, 148, 150, 188, 190 y 194), en verde la región antigénica 8-2 (180 y 183), en celeste la región antigénica 8-3 (residuos 114, 116, 132, 133, 135 y 136), en violeta la región antigénica 8-4 (residuos 87,88 y 89). Los sitios de clivaje para la tripsina se muestran en color amarillo. Los recuadros negros indican las mutaciones de aa que ocurrieron en las regiones antigénicas con respecto a la cepa UK.

Fig. 32.2

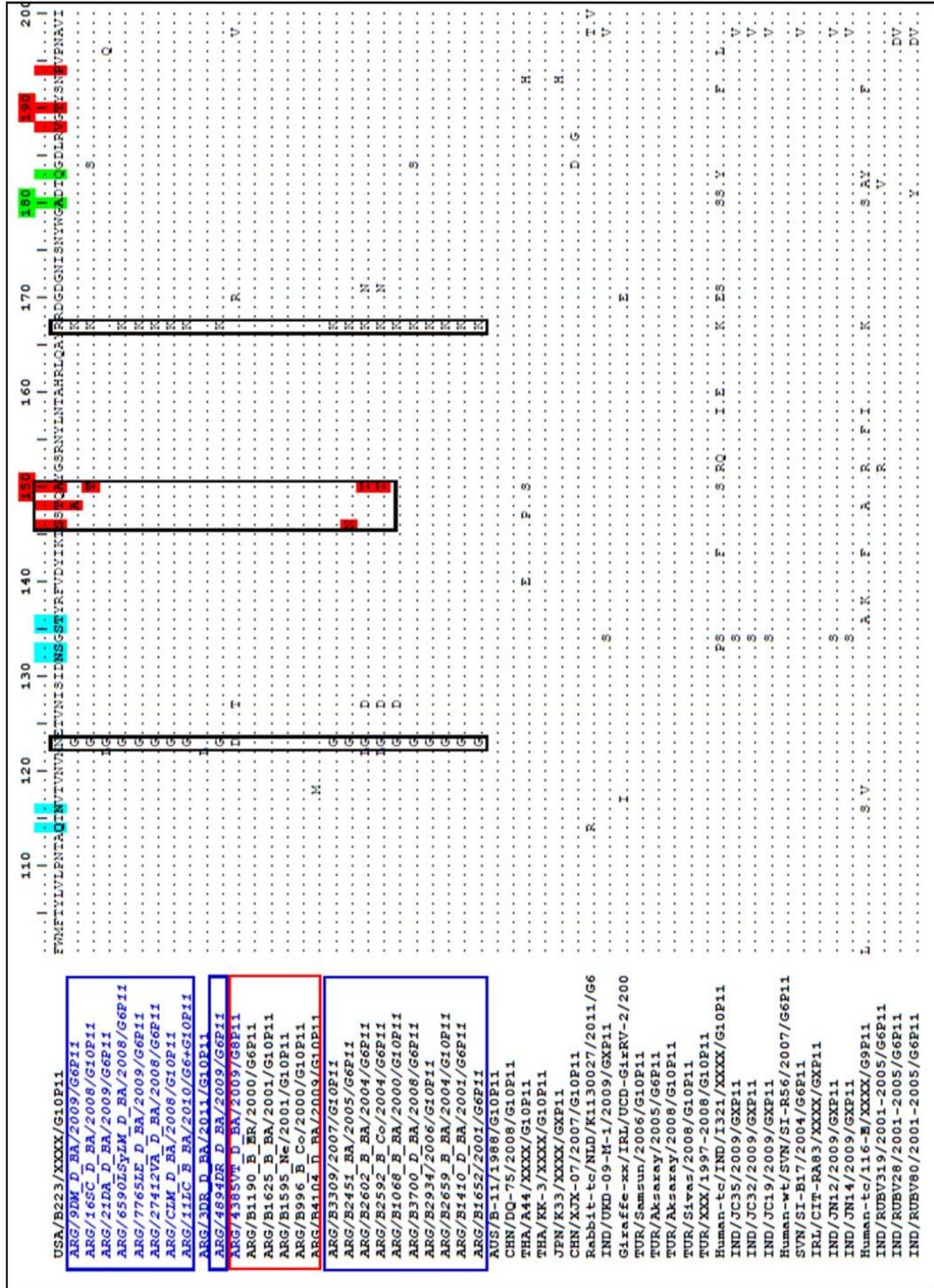


Fig. 32.2. Representación esquemática de las secuencias deducidas de aa de la subunidad VP8* para las cepas P[11]. En letras azules se indican las cepas argentinas que fueron caracterizadas en el presente estudio y los recuadros azules indican el linaje (II) y el recuadro rojo el linaje (III). Para aquellas cepas que son de un origen diferente al bovino se especifica la especie hospedadora en el nombre. El guión indica coincidencia en el residuo de aa para cada posición con respecto a la cepa vacunal B223 (G10P[11]). La cruz (x) indica finalización de la secuencia de aa. En rojo se representa la región antigénica 8-1 (residuos 100, 146, 148, 150, 188, 190 y 194), en verde la región antigénica 8-2 (180 y 183), en celeste la región antigénica 8-3 (residuos 114, 116, 132, 133, 135 y 136), en violeta la región antigénica 8-4 (residuos 87,88 y 89). Los sitios de clivaje para la tripsina se muestran en color amarillo. Los recuadros negros indican las mutaciones de aa que ocurrieron en las regiones antigénicas con respecto a la cepa B223.

Apéndice 2

I) Reactivos de Laboratorio

1. Solución buffer fosfato (PBS) 10X

ClNa	80 g
ClK	2 g
Na ₂ HPO ₄	25,4 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O.....	28,9 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Agua destilada, c.s.p.....	100 ml
pH 7,4 (ajustado con NaOH/HCl 1N)	

2. PBS 1X

PBS 10X	100 ml
Agua destilada, c.s.p.....	1000 ml

3. Soluciones utilizadas para ELISA

3.1 Buffer coating (carbonato/bicarbonato)

Na ₂ CO ₃	0,159 g
NaHCO ₃	0,293 g
Agua destilada c.s.p.....	100 ml
pH 9,6 (ajustado con NaOH/HCl 1N)	
Temp. de conservación: 4 °C	

3.2 Buffer ácido cítrico

Ácido cítrico monohidrato.....	0,960 g
NaOH 1N (para llevar a pH 5, 0).....	10 ml aprox.
Agua destilada c.s.p.....	100 ml
pH 5,0 (ajustado con NaOH/HCl 1N)	
Temp. de conservación: 4 °C	

3.3 ABTS (solución madre)

ABTS.....	0,22 g
Buffer de ácido cítrico.....	10 ml
Se fracciona en alícuotas de 1 ml en tubos plásticos de microcentrífuga	
Temp. de conservación: - 20 °C	

3.4 ABTS (solución de revelado)

Solución madre de ABTS.....	300 µl
Buffer de ácido cítrico.....	10 ml
Agua oxigenada.....	10 ml

3.5 Solución de lavado (PBS 1X, Tween 0,05%)

PBS 1X.....	100 ml
Tween 20.....	0,5 ml

3.6 Buffer de bloqueo (PBS 1X, Tween 0,05%, leche 10%)

Leche descremada.....	10 g
Tween 20.....	0,5 ml
PBS 1X (c.s.p.).....	100 ml

4. Preparación de geles de agarosa y electroforesis

4.1 EDTA (0,5 M)

EDTA.....	18,6 g
Agua destilada c.s.p.....	100 ml
pH 8 (ajustado con NaOH/HCl 1N)	

4.2 Buffer TAE 50X

Tris (trizma base) 2M.....	10 g
Ácido acético glacial.....	0,5 ml
EDTA 0,5 M (pH 8).....	50 ml
Agua destilada c.s.p.....	100 ml

4.3 Buffer TAE 1X

TAE 50X.....	10 ml
Agua destilada c.s.p.....	490 ml

4.4 Gel de agarosa al 1,6% teñido con SYBR Safe

Agarosa (Biodynamics, SRL).....	1,28 g
TAE 1X.....	80 ml
SYBR Safe (Life Technologies)*.....	6,4 µl

* Para BrEt se utiliza 4 µl (10 mg/ml)

II) Medios de cultivo y otros reactivos para virología

1. MEM (Gibco, cat. # 41500-034), para 1 L

Polvo (con sales de Earle's, L-glutamina y NEAA).....9,6 g

NaHCO₃.....2,2 g

HEPES.....2,38 g

2. HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # H3375-100G)

3. Solución de antibiótico (Gibco, antibiótico-antimicótico, cat. # 15240-062)

Penicilina G sódica.....10000 U/ml

Sulfato de estreptomicina.....10000 µg/ml

Anfotericina B.....25 µg/ml

4. Pancreatina 10X (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # P3292-100G)

Pancreatina Gibco.....2.50 g

NaCl.....0.85 g

Agua tridestilada.....100 ml

Esterilizar por filtración (1° filtro 0.45 µm; 2° filtro 0.22 µm). Posteriormente, realizar una dilución 1/10 en PBS para obtener una concentración de 25 µg/ml (**Pancreatina 1X**) y fraccionar en alícuotas de 1 ml. Almacenar a -20 ± 5° C. Se adiciona 1 ml de Pancreatina 1X por cada 100 ml de medio de trabajo.

5. Acetona al 70%

Acetona calidad analítica.....700 ml

Agua tridestilada.....300 ml

6. Ac Anti-RV marcado con FICT (PR 765/11) y diluido 1/100 y 1/150 en sol. de Azul de Evans.

7. Azul de Evans en PBS 1X (dilución de uso 1/200)

8. Tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # T4799-100G)

II) *Medios de cultivo y otros reactivos para bacteriología*

1. Agar MacConkey, Difco BD (Cat. # 212123)

Fórmula aproximada por litro (pH 7.1 ± 0.2)

Digestión pancreática de gelatina	17,0 g
Peptonas (carne y caseína)	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares No. 3.....	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro.....	0,03 g
Cristal violeta.....	1,0 mg

El polvo (50 g) se suspende en 1 litro de agua ultrapura. Luego se calienta con agitación frecuente hasta la ebullición y se mantiene por 1 min. para disolver completamente el polvo. Posteriormente, se coloca en autoclave a 121 °C durante 15 min.

2. Agar Triptona de Soya (CM 0131, Oxoid, Basingstoke, UK)

Fórmula aproximada por litro (pH 7,3 ± 2)

Digestión pancreática de caseína.....	15,0 g
Digestión enzimática de poroto de soja Peptona	5,0 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g

El polvo (40 g) se suspende en 1 litro de agua ultrapura. Luego se calienta con agitación frecuente hasta la ebullición y se mantiene por 1 min. para disolver completamente el polvo. Posteriormente, se coloca en autoclave a 121 °C durante 15 min.

3. Medio de mantenimiento con 0,75% de agar (Blanco y Blanco, 1993)

Fórmula aproximada por litro (pH 6,8 ± 2)

Agar nutritivo.....	11,5 g
Caldo nutritivo.....	4 g
Agua destilada.....	csp 1000 ml

Se coloca en autoclave a 121 °C durante 15 min.

a) Agar Nutritivo, Difco BD (Cat. # 213000)

Fórmula aproximada por litro

Extracto de carne.....	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g

b) Caldo Nutritivo, Difco BD (Cat. # 234000)

Fórmula aproximada por litro

Extracto de carne.....	3,0 g
Peptona	5,0 g

4. Agar Müeller Hinton, Difco BD (Cat. # 225250)

Fórmula aproximada por litro (pH 7.3 ± 0.1)

Polvo de extracto de carne.....	2,0 g
Digestión ácida de caseína.....	17,5 g
Almidón.....	1,5 g
Agar.....	17.0 g

5. Agar XLD (CM 0469, Oxoid, Basingstoke, UK)

Fórmula aproximada por litro (pH 7,4 ± 2)

Extracto de levadura.....	3 g
L-lisina HCl.....	5 g
Xilosa.....	3,75 g
Lactosa.....	7,5 g
Sucrosa.....	7,5 g
Desoxicolato de sodio.....	7,5 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Tiosulfato de sodio.....	6,8 g
Citrato de amonio férrico.....	0,8 g
Rojo fenol.....	0,08 g
Agar.....	12,5 g

6. Base caldo tetracionato (CM 0029, Oxoid, Basingstoke, UK)

Fórmula aproximada por litro (pH 8 ± 2)

Polvo "Lab-Lemco".....	0,9 g
Peptona.....	4,5 g
Extracto de levadura.....	1,8 g
Cloruro de sodio.....	4,5 g
Carbonato de calcio.....	25 g
Tiosulfato de sodio.....	40,7 g

IV) Técnicas histológicas

Preparación de cortes histológicos

Pasos

1. Alcohol 70° x 2 h.
2. Alcohol 80° x 2 h.
3. Alcohol 96° usado (Alcohol III): mínimo de 2 h.
4. Alcohol 96° usado (Alcohol IV) x 2 h.
5. Alcohol 96° usado (Alcohol V) x 2 h.
6. Tolueno x 2 h en estufa.
7. Parafina: las muestras se colocaron en parafina derretida y se incubaron en estufa (58-60 °C) durante 1:40 h.
8. Transcurrido el período de incubación, las muestras se retiraron de la estufa y se embebieron en parafina líquida. Una vez solidificados, los tacos fueron conservados a 4 °C.
9. Se realizaron cortes de 3-5 µm mediante un micrótomo. Los cortes de tejido se colocaron en agua (50-55 °C) para estirarlos y posteriormente colocarlos sobre portaobjetos (previamente sumergidos en alcohol).
10. Los portaobjetos fueron incubados en estufa (56-58 °C) durante 15-20 min para su secado.

Tinción de hematoxilina-eosina (HE) para cortes histológicos

Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina, de acuerdo al siguiente protocolo, para su observación en el microscopio óptico.

Pasos

1. Xilol x 5 min para desparafinar y deshidratar.
2. Xilol: sumergir y sacar.
3. Secar los portaobjetos con papel absorbente.
4. Alcohol 96°: sumergir y sacar.
5. Alcohol 96°: sumergir y sacar. Se dejan escurrir bien los portaobjetos.
6. Agua destilada: sumergir y sacar.
7. Hematoxilina de Gill: los portaobjetos se sumergen x 5 min.
8. Agua de la canilla: un baño.
9. Decoloración de la hematoxilina: se realiza mediante un baño rápido en una solución de alcohol 70° (99 ml) y HCl (1 ml) (se sumerge 3 veces). Inmediatamente se realiza un baño en agua tibia de la canilla.

10. Se realiza la coloración de contraste (eosina amarillenta) x 1 min.
11. Luego se realizaron 3 inmersiones en alcohol 96° de forma consecutiva y en diferentes recipientes.
12. Después se hacen 2 inmersiones en xilol de forma consecutiva y en diferentes recipientes.
13. Los portaobjetos se secaron y se colocaron los cubreobjetos para observar los cortes histológicos en el microscopio óptico.